



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

Untersuchung einer antikanzerogenen Wirkung der physiologischen Tetrapyrrole Bilirubin, Bilirubin Konjugat, Bilirubin Dimethylester und Protoporphyrin auf humane Leberkrebszellen HepG2

Verfasserin

Antonia Roßmann, Bakk. rer. nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, Juli 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften

Betreuer:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner

DANKSAGUNG

Die großartige Unterstützung und Begleitung während meiner gesamten Studienzeit und insbesondere der Verfassung meiner Masterarbeit waren für mich ein wichtiges Fundament meines Erfolgs. Ich möchte nun die Gelegenheit nützen um all jenen zu danken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen und grundlegend für das Entstehen der vorliegenden Arbeit mitverantwortlich sind.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner für die Überlassung meiner Masterthese sowie die Bereitstellung der Materialien und Technik zur Durchführung der laborchemischen Tests. Vielen Dank auch für ihre kollegiale Betreuung und die engagierte Beseitigung organisatorischer Hindernisse!

Besonderer Dank gilt Frau Mag. Christine Mölzer, Bakk. für die tolle Betreuung der Arbeit im Labor, ihr immer offenes Ohr und die äußerst engagierte wissenschaftliche Begleitung durch alle Phasen meiner Masterarbeit. Deine fachliche Expertise, deine Ratschläge und die gewissenhaften Korrektursichten waren mir stets eine große Hilfe!

Auch dem restlichen Spange E-Team möchte ich an dieser Stelle meinen Dank für den Erfahrungsaustausch und die oft spontane fachliche Unterstützung aussprechen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Gerhard und Elisabeth, die meine Vorhaben nach wie vor ausnahmslos unterstützen und mir so meinen Werdegang ermöglichen. Ich danke euch für den Glauben an meine Fähigkeiten und dass ihr mich zu der Person gemacht habt die ich heute bin!

Meine Dankbarkeit gilt außerdem meinem Freund Christoph für seine Unterstützung und den selbstlosen Verzicht auf viele gemeinsame Aktivitäten sowie Katrin und Kristina für die regelmäßigen motivierenden Worte aus der Ferne.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch ganz herzlich bei meiner Projektpartnerin Barbara Pfleger, MSc. für die tolle und effektive Zusammenarbeit sowie die lustige gemeinsame (Frei-) Zeit bedanken. Ich hätte mir keine bessere Kollegin vorstellen können!

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
II. LITERATURÜBERBLICK	4
1. Historischer Rückblick	4
2. Getestete Tetrapyrrole – Chemie und Eigenschaften	6
2.1 Bilirubin IX α	6
2.2 Bilirubin Konjugat (Ditaurat)	9
2.3 Bilirubin Dimethylester	11
2.4 Protoporphyrin	12
3. Physiologie und Stoffwechsel humaner Tetrapyrrole	15
3.1 Das Häm-Molekül	15
3.2 Biosynthese des Häms	16
3.3 Häm-Katabolismus	20
3.3.1 Prähepatische Phase des Hämabbaus	22
3.3.2 Intrahepatische Phase des Hämabbaus	22
3.3.3 Posthepatische Phase des Hämabbaus	23
4. Störungen des Tetrapyrrolstoffwechsels	25
4.1 Toxizität pathologisch erhöhter Bilirubinspiegel	25
4.2 Erworbene Hyperbilirubinämien	26
4.3 Angeborene Hyperbilirubinämien	27
4.4 Hepatische Porphyrien	29
5. Physiologische Bedeutung humaner Tetrapyrrole	31
5.1 Antioxidatives Potenzial	31

5.2 Vasoprotektive Eigenschaften	34
5.3 Antiinflammatorisches Potenzial	36
5.4 Antikanzerogene Aktivität	36
5.5 Antimutagenes Potenzial	38
5.6 Antivirale Eigenschaften	39
III. MATERIAL UND METHODEN	40
1. Studiendesign	40
2. Vortestphase	40
3. Verwendete Materialien und Laborausrüstung	41
3.1 HepG2-Zellproben	41
3.2 Chemikalien	42
3.3 Tetrapyrrole	42
3.4 Laborzubehör	43
3.5 Labortechnik und verwendete Geräte	43
4. Herstellung der benötigten Lösungen und Reagenzien	45
4.1 Nährmedium zur Kultivierung der Zellen	45
4.2 Stocklösungen der Gallenpigmente	45
4.3 Agarosegele	46
4.4 Lösungen und Reagenzien für den Comet Assay-Test	47
4.5 Ethidiumbromid-Fluoreszenzfarbreagens	50
5. Zellkultur	51
5.1 Zellen auftauen	52
5.2 Kryokonservierung (Zellen einfrieren)	52
5.3 Medienwechsel („Zellen füttern“)	52
5.4 Zellpassage	53

3.5 Bestimmung der Zellzahl (Trypanblau-Test)	54
6. Testvorbereitung	55
6.1 Zellen aussäen	55
6.2 Tetrapyrrol-Inkubation	56
6.3 Beschichtung der Objektträger	56
6.4 Probenaufbereitung für den Comet Assay-Test	57
7. Comet Assay	58
7.1 Aufbringen der Zellsuspension	59
7.2 Zellstressung	60
7.3 Lyse	61
7.4 Elektrophorese	62
7.5 Neutralisation	63
8. Weitere Tests	64
9. Auswertung	66
9.1 Färben der Zellgele	66
9.2 Auszählen der Zellgele	67
9.3 Datenauswertung	68
9.4 Statistische Auswertung	69
IV. ERGEBNISSE	70
1. Bilirubin	70
2. Bilirubin Ditaurat	74
3. Bilirubin Dimethylester	77
4. Protoporphyrin	80
V. DISKUSSION	84

VI. CONCLUSIO	89
ZUSAMMENFASSUNG	90
ABSTRACT	91
LITERATURVERZEICHNIS	92
WEBVERZEICHNIS	106
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	107
TABELLENVERZEICHNIS	110

I. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Humane Tetrapyrrole - die Farben des Lebens. Lange Zeit eilte den Gallenpigmenten und seinen Derivaten ein Ruf als toxische Abfallprodukte des menschlichen Organismus voraus. Heute betrachtet man ihre Wirkung etwas differenzierter und misst ihnen physiologische Bedeutung bei.

Während insbesondere das Bilirubin, in der Indischen und Traditionellen Chinesischen Medizin schon vor tausenden von Jahren gezielt zur Therapie bestimmter Erkrankungen eingesetzt wurde, galten Gallenpigmente in unseren Breiten lange Zeit als unbrauchbare, toxische Häm-Abbauprodukte. In der modernen westlichen Medizin wurden sie demnach eher als ursächlicher Faktor im Kontext mit Leberfunktionsstörungen sowie angeborenen Stoffwechselerkrankungen (z.B.: Gilbert's Syndrom) respektive damit verbundenen Hyperbilirubinämien und (Neugeborenen-) Ikterus betrachtet.

„Dosis sola facit venenum“- Paracelsus erkannte bereits 1538, dass toxischen Substanzen nicht grundsätzlich negative Wirkungen beizumessen sind. Im Gegenteil, „die Dosis macht das Gift“. Dieser Erkenntnis zufolge rückten Gallenpigmente in den letzten Jahrzehnten auch in der modernen Medizin verstärkt ins Licht der Wissenschaft.

Heutzutage stellen Tetrapyrrole ein großes und wichtiges Forschungsgebiet dar. So konnten bisher wertvolle Erkenntnisse über ihre antioxidativen, antimutagenen, anti-komplementären, antiinflammatorischen, antiapoptotischen, antibakteriellen und antiviralen Eigenschaften bei moderat erhöhten Blutspiegeln gewonnen werden [Bulmer *et al.* 2008a]. Besondere Bedeutung kommt diesen im Zusammenhang mit ihrer nachweislich protektiven Wirkung bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen und dem zentralen Nervensystem in Verbindung mit oxidativem Stress zu. Auch antikanzerogene Wirksamkeit wird den Gallenpigmenten nach heutigem Wissen zugeschrieben [Hunt *et al.* 2001; Liu *et al.* 2006; Vitek *et al.* 2002].

Die Literatur bietet gegenwärtig sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Vielzahl an Untersuchungen im Zusammenhang mit physiologischen Wirkungsweisen der Gallenpigmente und ihrer Derivate. Dennoch ist die Datenlage in manchen Belangen insbesondere auf *in vivo* Ebene äußerst gering, was die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen unabdingbar macht.

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit stellt eine kürzlich diskutierte antikanzerogene Eigenschaft humaner Gallenpigmente und ihrer Derivate dar. Es handelt sich bei dieser Thematik um ein relativ junges Forschungsgebiet, was dahingehend ein sehr geringes Ausmaß an Informationen mit sich bringt.

Das Ziel der vorliegenden *in vitro* Studie ist demnach, einen wertvollen Beitrag zur aktuellen Datenlage zu leisten und weitere Fortschritte in der Beleuchtung des komplexen Systems der Krebserkrankungen und möglicher Therapeutika zu bringen. Mit Ausblick auf längerfristige Etablierung einer neuen Therapieform zur Behandlung von Krebserkrankungen ist insbesondere die Untermauerung bereits bestehender Hypothesen sowie die Ergänzung durch neue Erkenntnisse gefragt.

Die Arbeit untersucht antikanzerogene Effekte der humanen Tetrapyrrole Bilirubin IX α , Bilirubin Ditaurat, Protoporphyrin IX und Bilirubin Dimethylester auf die Leberkrebszelllinie HepG2. Mit Ausnahme entsprechender Effekte des Bilirubins ist dieses Themengebiet bisher gänzlich unerforscht.

Ein Blick auf aktuelle Zahlen hinsichtlich der Mortalität und Inzidenz von Krebserkrankungen in Österreich zeigt deutlich, welchen Stellenwert diese in der Gesellschaft bereits eingenommen haben. So stellen bösartige Tumorerkrankungen unmittelbar nach Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar.

Die Mortalität an Leberkrebs im Speziellen hat in den letzten 20-25 Jahren erheblich zugenommen. Die Zahl der Neuerkrankungen hingegen hat sich in diesem Zeitraum sogar verdoppelt [Statistik Austria 2012 a,b]. Die genannten Zahlen sprechen für sich

und machen die Notwendigkeit geeigneter Präventivmaßnahmen sowie erfolgreicher Therapie- und Heilungsmöglichkeiten deutlich.

In Zusammenarbeit mit meiner Kollegin Barbara Pfleger, die sich in ihrer Arbeit mit entsprechenden Effekte der genannten Tetrapyrrole auf die Darmkrebszelllinie Caco 2 beschäftigt, haben wir gemeinsam versucht einen weiteren wichtigen Schritt in der Erforschung des antikanzerogenen Potenzials von humanen Tetrapyrrolen zu setzen. Die folgenden Kapitel sollen einen fundierten Überblick über den aktuellen Wissensstand zu Gallenpigmenten und ihren Derivaten geben. Die anschließende Diskussion der Ergebnisse aus den *in vitro* Tests sollen den Grundstein für viele folgende Arbeiten legen.

II. LITERATURÜBERBLICK

1. Historischer Rückblick

Funktionelle Tetrapyrrole und ihre Derivate zur Heilung von Krankheiten einzusetzen ist durchaus kein neuer Gedanke. In der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) ist insbesondere das Bilirubin schon seit mehr als 2000 Jahren für seine kurativen Fähigkeiten bekannt [Qin 2008]. Publik unter dem Namen *Calculus bovis* (gleichbedeutend dem chinesischen *Niu Huang*) stellt es auch heute noch eines der bekanntesten Naturheilmittel traditioneller und alternativer Medizin im chinesischen und asiatischen Raum dar [Zang *et al.* 2008]. Der so bezeichnete Gallenstein des *Bos taurus domesticus* Gmelin, einer asiatischen Rinderart, hat als natürliche Form des Heilmittels seinen Wert. Der Preis von nativem *Calculus bovis* ist etwa doppelt so hoch wie der von Gold. Es wird daher heutzutage neben natürlicher Züchtung hauptsächlich synthetisch hergestellt [Qin 2008].

Zusätzlich zu der Normalisierung der Gallenblasenfunktion werden *Calculus bovis* auch beruhigende, fiebersenkende, schmerzlindernde, krampflösende, entzündungshemmende und immunregulierende Wirkungen sowie antikanzerogene Effekte zugeschrieben [Zang *et al.* 2008]. Ihre Verabreichung erfolgt in Form von getrockneten und meist pulverisierten Gallensteinen unter anderem zur Therapie von Bronchitis, Asthma, stressbedingten Hypersensitivitäten, Epilepsie, Fieber, Krämpfen, gastrointestinalen Störungen, Gesichtswarzen sowie zur Verbesserung des Sehvermögens. Darüber hinaus wird *Calculus bovis* auch als Abtreibungs- und Potenzmittel eingesetzt [Read 1976].

Mitte des 20. Jahrhunderts wurden erstmals antioxidative Effekte des Bilirubins *in vivo* beobachtet, was das wissenschaftliche Interesse für physiologische Tetrapyrrole in

unseren Breiten maßgeblich stärkte. Zahlreiche nachfolgende Studien widerlegen immer wieder seinen Ruf als toxisches Stoffwechselprodukt und legen seine positiven Wirkungsweisen dar. Sie geben Hinweise auf antikomplementäre, antiinflammatorische, antivirale, antiapoptotische sowie antimutagene Wirkungen der Gallenpigmente und ihrer Derivate [Bulmer *et al.* 2008a].

2. Getestete Tetrapyrrole – Chemie und Eigenschaften

2.1 Bilirubin IX α

In seiner Rolle als ursächlicher Faktor für die Gelbfärbung von Haut und Skleren im Rahmen einer Gelbsucht (Ikterus), stellt Bilirubin IX α den wohl bekanntesten Vertreter humaner Gallenpigmente dar [Tomaro und Batlle 2002]. Der gelblich-orange Farbstoff entstammt als sekundäres Abbauprodukt [Sedlak und Snyder 2004] dem Abbau des Häm-Moleküls aus Hämoglobin und anderen Hämproteinen wie beispielsweise Myoglobin und Cytochrom p450 [Kapitulnik 2004].

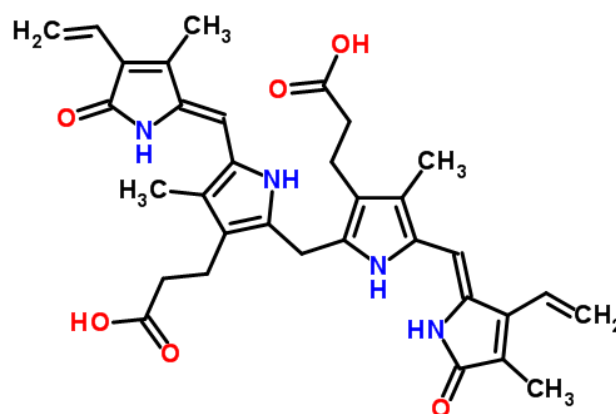


Abb. 1: Chemische Struktur des Bilirubin IX α Moleküls.

Seiner chemischen Struktur zu Folge handelt es sich um ein lineares, offen gebautes Tetrapyrrol aus einer Kette von 4 kovalent gebundenen Pyrrolringen [Tomaro und Batlle 2002]. Die Anwesenheit mehrerer polarer Substituenten, wie die beiden Propionyl-Seitenketten und Aminogruppen, bedingen eine starke Hydrophobie dieses Moleküls [Wang *et al.* 2006]. Als eine sehr stabile Substanz besitzt Bilirubin die Eigenschaft, rela-

tiv leicht zu kristallisieren. Unter aeroben Umständen und zusätzlicher Einwirkung von UV-Strahlen reagiert es jedoch photosensitiv [McDonagh 2010].

Unter physiologischen Bedingungen liegt der Großteil des Bilirubins IX α (96 %) im Blut in unkonjugierter (= nicht gekoppelter [Siegenthaler 1973] oder auch indirekter [Königshoff und Brandenburger 2007]) Form vor [Wang *et al.* 2006]. Seine schlechte Wasserlöslichkeit (< 7nM [Brodersen 1979]) erfordert eine Bindung an das Plasmaprotein Albumin, welches den Transport in die Leber zum Abbau und im weiteren Sinne seiner Ausscheidung bewerkstelligt. Eine Eigenschaft, die für den Stoffwechsel erhebliche Nachteile hat. Einerseits auf Grund seiner toxischen Eigenschaften für eine Vielzahl an Körpergeweben, insbesondere seine Neurotoxizität und die erhöhte Neigung des Bilirubins zur Bildung von Gallensteinen. Vielmehr jedoch hinsichtlich der Notwendigkeit einer Weitermetabolisierung, ohne die seine Ausscheidung unmöglich wäre. Das würde eine Akkumulierung des toxischen Substrates zur Folge haben [Löffler *et al.* 2006].

Diese Tatsache wirft die nachstehende, grundlegende Frage auf: weshalb etablierte die Natur im Laufe der Evolution den Abbauschritt von Biliverdin, einem wasserlöslichen und leicht ausscheidbaren Metaboliten zu Bilirubin, einem vollkommen wasserunlöslichen und noch dazu toxischen Stoffwechselprodukt [Liu *et al.* 2006] – ein Stoffwechselweg auf Kosten von Zellressourcen und zusätzlichem Energieaufwand [Sedlak und Snyder 2004]? Vor allem weil diese Gegebenheiten absolut der natürlichen Tendenz des Organismus in Hinblick auf die Detoxifizierung widersprechen, aus weniger polaren Metaboliten polare und wasserlösliche zu machen, die so leicht eliminiert werden können [Ryter und Tyrrell 2000].

Die Erklärung dafür dürfte im stark antioxidativen Potential des Bilirubins begründet sein, was diesen potenziell zytotoxischen Metaboliten zu einem physiologisch sehr Wertvollen macht [Sedlak und Snyder 2004]. Seine damit verbundenen zellprotektiven Eigenschaften [Liu *et al.* 2006] und die Schutzwirkung vor diversen pathologischen Mechanismen im Zuge von kardiovaskulären, hepatischen und neurologischen Erkrankun-

gen [Kapitulnik 2004] sowie Krebs und Diabetes Mellitus Typ II machen sämtliche negativen Assoziationen wieder wett. Neben seinen ebenso propagierten antiinflammatorischen und antimutagenen Eigenschaften besitzt es effektive Radikalfänger-Kapazitäten [Zelenka *et al.* 2012] die gleichermaßen für die Immunoprotektion eine Rolle spielen dürften [Kapitulnik 2004].

Auch prooxidative Wirkungsweisen des Bilirubins zeigen im Zusammenhang mit humanen Karzinomzellen günstige Effekte. Durch darauf zurückzuführende Zerstörung der Krebszellen weisen Rao und Kollegen in ihrer Arbeit auf ein antikanzerogenes Potenzial des Bilirubins hin [Rao *et al.* 2006].

Ein weiterer Aspekt könnte die Plazentagängigkeit des Bilirubins sein. Während dieses relativ einfach vom fetalen in den maternalen Blutkreislauf transferiert werden kann, gestaltet sich der Austausch von Biliverdin wesentlich schwieriger [Sedlak und Snyder 2004].

Der menschliche Organismus produziert täglich etwa 300 mg Bilirubin [Stocker 2004]. Die molare Konzentration im Blut beträgt 3-17 $\mu\text{mol/l}$ und übersteigt die des Albumins (500-700 $\mu\text{mol/l}$) unter physiologischen Umständen nicht. Steigt jedoch die molare Ratio Bilirubin:Albumin über 1 kommt es zur Akkumulierung von freiem Bilirubin [Wang *et al.* 2006], welches die Fähigkeit besitzt mittels erleichterter Diffusion im Körper verteilt zu werden und seine toxischen Eigenschaften zu entfalten [Ostrow und Tiribelli 2003].

Bei Neugeborenen ist freies Bilirubin in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden [Zhou *et al.* 2010]. Das Vorliegen einer Hyperbilirubinämie kann auf diese Weise zu neurologischen Dysfunktionen führen, welche die Entwicklung einer Bilirubinenzephalopathie (Kernikterus) zur Folge haben [Wang *et al.* 2006].

Im Normalfall liegt jedoch weniger als 0,1% der Blutplasmakonzentration in freier, nicht-albumingebundener Form vor [Ostrow und Tiribelli 2003].

Erhöhte Plasmabilirubinspiegel treten insbesondere in Form der neonatalen Hyperbilirubinämie (Neugeborenenikterus), sowie bei Patienten mit erworbenen oder angeborenen Defekten (Gilbert Syndrom, Crigler-Najjar Syndrom) in Hinblick auf Bilirubinspeicherung und –ausscheidung in Erscheinung. Der Schweregrad und seine mehr oder weniger stark ausgeprägten Symptome sollen gesondert in *Kapitel 4 – Störungen des Tetrapyrrolstoffwechsels* beleuchtet werden.

Milde Formen einer unkonjugierten Hyperbilirubinämie mit Plasmaspiegeln bis maximal 85 $\mu\text{mol/l}$ jedoch, könnten im Sinne der bereits erwähnten antioxidativen Wirkung mit zellprotektiven Effekten [Wang *et al.* 2005] und darüber hinaus einer geringeren Prävalenz für kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs einhergehen [Vitek *et al.* 2002; Lin *et al.* 2006].

Unter diesem Aspekt werden die Salze des Bilirubins schon seit langer Zeit von Vertretern der Traditionellen Chinesischen Medizin als Medikamente zur Heilung von Krankheiten und der Induktion von Apoptose und Nekrose in Leberkrebszellen eingesetzt [Rao *et al.* 2006].

2.2 Bilirubin Konjugat (Ditaurat)

Das Schlüsselmolekül für eine ausgeglichene Bilirubinbilanz im menschlichen Organismus ist ohne Zweifel die konjugierte (= direkte [Königshoff und Brandenburger 2007]) Form des Bilirubins, das sogenannte Bilirubin Konjugat [Bulmer *et al.* 2008b]. Jirsa und Kollegen bezeichnen es auch als ‚Taurobilirubin‘ [Jirsa *et al.* 1995].

Durch Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Propionyl- und den Amino- und Lactamgruppen besitzt dieses Molekül den nötigen Grad an Wasserlöslichkeit um vom Körper entgiftet werden zu können [Wang *et al.* 2006]. Der Nachteil den

diese Polarität mit sich bringt, ist die Unfähigkeit des Bilirubin Konjugats durch Lipidmembranen zu diffundieren [Bulmer *et al.* 2007].

Diese Glucuronidierungsreaktion, vermittelt durch die UDP-Glucuronyltransferase (UGT1A1), bringt auf diese Weise entweder Bilirubin-Monoglucuronid (-Monotaurat) oder aber Bilirubin-Diglucuronid (-Ditaurat) hervor und stellt somit einen essentiellen Reaktionsweg für den Entgiftungsprozess der Leber dar [Labori *et al.* 2009]. Mit einem Anteil von etwa 80% ist in der menschlichen Leber, wie auch der der Ratte, bevorzugt die Diglucuronid-Form vorhanden [Crawford *et al.* 1992].

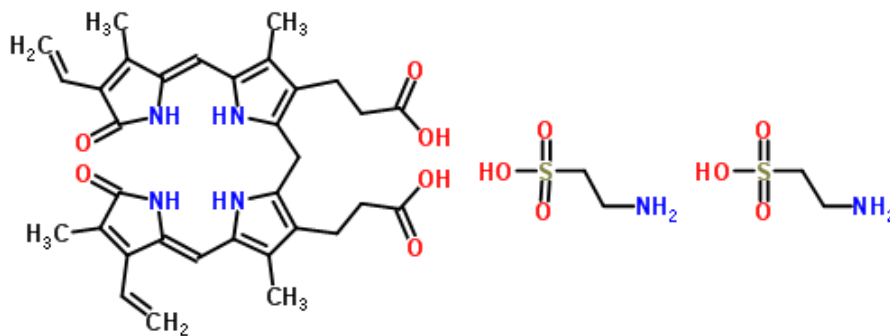


Abb. 2: Chemische Struktur des Bilirubin Konjugats.

Unter normalen Umständen liegen etwa 98-99% des Gesamtbilirubins in konjugierter Form vor [Tomaro und Batlle 2002]. Den größten Körperpool bilden dahingehend die Galle und das Intestinum [Stocker und Ames 1987].

Die physiologische Bedeutung des Bilirubin Konjugats ist auf seine Fähigkeit der Eliminierung von Peroxylradikalen zurückzuführen. Sein antioxidatives Potenzial dient im Organismus dem Schutz vor Lipidperoxidation [Stocker und Ames 1987]. *In vitro* Studien geben Hinweise auf eine mögliche antimutagene Wirkung dieses Tetrapyrrols [Bulmer *et al.* 2007].

Bilirubin Ditaurat bezeichnet im eigentlichen Sinn ein synthetisch her- bzw. nachgestelltes Tetrapyrrol. Da physiologisches Bilirubin-Diglucuronid unter *in vitro* Konditionen eine sehr labile Verbindung darstellt, kann dieses für experimentelle Zwecke nicht genutzt werden. Davon abgesehen, ist auch ausschließlich das Synthetikum kommerziell erhältlich [Bulmer *et al.* 2008c].

2.3 Bilirubin Dimethylester

Durch Veresterung der Propionsäuregruppen des Bilirubins mit Einfachzuckern wie beispielsweise D-Glucose oder D-Xylose sowie mit Uronsäure entsteht sein Derivat, der Bilirubin Dimethylester. Sehr wahrscheinlich wird der Großteil des unkonjugierten Bilirubins mit β -D-Glucopyranuronsäure konjugiert, wobei zu einem geringen Teil auch die Konjugierung mit komplexeren Oligosacchariden stattfinden kann. Esterasen und Glucuronidasen wandeln Bilirubin Dimethylester zu Bilirubin Konjugat um und bieten so dem Stoffwechsel, neben Bilirubin Ditaurat, ein weiteres ausscheidbares Konjugatderivat [Hutchinson *et al.* 1972].

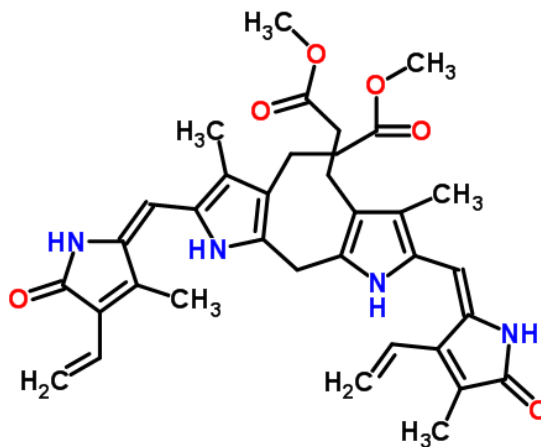


Abb. 3: Chemische Struktur des Bilirubin Dimethylesters.

In das Blut werden Bilirubin Dimethylester-Konjugate in Form von Bilirubin 1-O-Acylglucuroniden abgegeben [Muraca und Blankaert 1983].

Die physiologische Wertigkeit des Bilirubin Dimethylesters liegt in seinem antioxidativen Potenzial und der Fähigkeit intermediär produzierte Peroxylradikale eliminieren zu können [Chepelev *et al.* 2005].

Die synthetische Herstellung des Bilirubin Dimethylesters erfordert hinsichtlich der Labilität von Bilirubin im sauren oder basischen Milieu besondere Sorgfalt und sollte unter möglichst schonenden Bedingungen erfolgen. 1-Alkyl-3-p-tolyltriazin IV gewährleistet dahingehend eine zügige und mengenmäßig ausgiebige Veresterung der Carboxylsäuren. Dem Ergebnis einer Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) zufolge, ist diesbezüglich das Vorkommen der Lactamkonstellation (= Amidbindung zwischen einer Amino- und einer Carboxygruppe desselben cyclischen Moleküls) am Ring A und D seltener als jenes der Lactimform (= zyklische Stickstoffverbindungen mit der funktionellen Gruppe $(-N=C-OH-)$) [Hutchinson *et al.* 1972].

2.4 Protoporphyrin

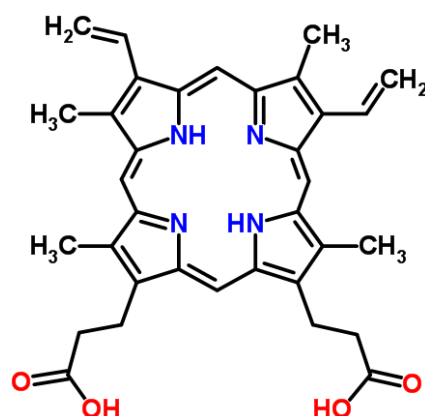


Abb. 4: Chemische Struktur des Protoporphyrin IX.

Der Protoporphyrin IX Makrozyklus fungiert als farbgebende Komponente des Häms [Gossauer 1994]. Die Synthese erfolgt durch Entfernung des Eisen-Atoms aus einem Hämatin-Molekül. Im Zuge einer Oxidation der α -Methenbrücke würde in einem nächsten Schritt, durch Öffnung des Porphyrinrings und Verlust eines Kohlenstoffatoms, das Gallenpigment Biliverdin entstehen [Klatskin 1961].

In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff wird Protoporphyrin IX photooxidiert. Ein pathologischer Aspekt, der im Zusammenhang mit einer genetisch bedingten Erkrankung eine große Rolle spielt. Im Rahmen der erythropoietischen Protoporphyririe akkumulieren seine nicht-hämatischen Metallkomplexe in roten Blutkörperchen. Auf Grund der extremen Lichtsensitivität des Protoporphyrin IX vermögen jene Ablagerungen die Lipidmembranen der Erythrozyten zu zerstören und bedingen so eine erhebliche Lichtempfindlichkeit des Patienten [Cox und Whitten 1982].

Dennoch kann dieser Aspekt auch im positiven Sinne genutzt werden. Zawacka-Pankau und Kollegen haben festgestellt, dass Derivate des Protoporphyrin IX wie beispielsweise δ -Aminolävulinsäure, bedingt durch eine abweichende Häm-Biosynthese, auch in massiver Weise in Krebszellen angereichert werden. Dort binden sie an den Apoptose auslösenden p53 Tumorsuppressor und stören so die Interaktion zwischen diesem und seinem negativen Regulator HDM2. Die Folge dessen, ist wiederum eine Anreicherung des p53 und somit eine Verstärkung der pro-apoptotischen Aktivität [Zawacka-Pankau *et al.* 2007].

In diesem Sinne wird Protoporphyrin IX sehr erfolgreich in der photodynamischen Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen angewandt. Als alternative Heilungsmethode wird sie insbesondere zur Behandlung von Krebsarten, welche Chemo- und Strahlentherapie gegenüber resistent sind, eingesetzt [Zawacka-Pankau *et al.* 2007].

Zawacka-Pankau und Kollegen beobachteten diesen Effekt an Kolonkrebszellen, Bednarz und Kollegen kamen zu ähnlichen Ergebnissen im Zusammenhang mit Zervixkarzinomzellen (HeLa-Zellen). Weitere Studien belegen die Fähigkeit des Protoporphyrin IX

zelluläre Zerstörungen auch ohne den Einsatz von Licht hervorzurufen [Bednarz *et al.* 2007]. Konzentrationen von 0,5-100 µg/ml des Tetrapyrrols zeigen die Hemmung der Zellproliferation von HeLa-Zellen auch in dunkler Umgebung [Koningsberger *et al.* 1995].

3. Physiologie und Stoffwechsel humaner Tetrapyrrole

Das Schlüsselmolekül für die Bildung humaner Gallenpigmente und seiner Derivate ist das Häm. Seine Biosynthese und insbesondere sein Abbau repräsentieren die wesentlichsten Stoffwechselwege zur Bildung der in der vorliegenden Studie untersuchten, Tetrapyrrole Bilirubin IX α , Bilirubin Konjugat (Ditaurat), Bilirubin Dimethylester und Protoporphyrin IX.

3.1 Das Häm-Molekül

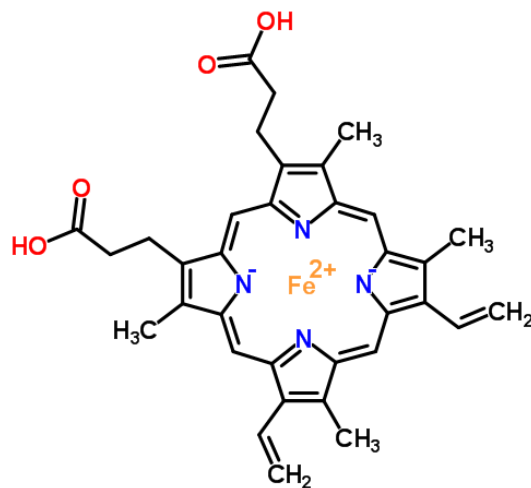


Abb. 5: Chemische Struktur des Häm-Moleküls.

Chemisch gesehen gehört Häm der Familie der Metalloporphyrine an. Es handelt sich um ein eben gebautes Komplexmolekül aus 4 Pyrrol-Ringen (Tetrapyrrol) – zyklisch verbunden durch 4 Methinbrücken – und einem zentralen Fe²⁺-Atom. An jedem dieser Ringe können maximal 2 Seitenketten substituiert sein, die unter anderem für die Bin-

dung an Proteine von Relevanz sein können [Wang *et al.* 2006; Ryter und Tyrrell 2000]. Dies ist besonders in Hinblick auf die hydrophobe Eigenschaft dieses Komplexes mit eher geringem Molekulargewicht von Bedeutung [Ryter und Tyrrell 2000].

In seiner Funktion als O₂-bindende Komponente wichtiger Schlüsselproteine, stellt das Häm-Molekül ein lebensnotwendiges Substrat des menschlichen Stoffwechsels dar. Die Rede ist von sogenannten Hämproteinen, für deren Synthese und Funktionalität es unerlässlich ist. Diese sind wesentlich an Prozessen des Sauerstofftransports, der Elektronenübertragung innerhalb der mitochondrialen Atmungskette, der Steroid-Biosynthese, der Signaltransduktion und des Medikamenten-Metabolismus beteiligt. Neben Myoglobin und den diversen Cytochromen, Katalasen und Peroxidasen spielt Häm insbesondere für die Synthese des Hämoglobins, eine große Rolle [Ryter und Tyrrell 2000].

3.2 Biosynthese des Häms

Die Synthese des Häms erfolgt in einer Kette von insgesamt 8 aufeinanderfolgenden Reaktionen. Grundsätzlich können diese in fast allen Geweben des menschlichen Körpers ablaufen. Zum überwiegenden Teil (ca. 85%) erfolgt die Bildung des Häm-Moleküls jedoch in den Mitochondrien und dem Zytoplasma des Knochenmarks und der Leber (10-20%) [Königshoff und Brandenburger 2007; Doenecke *et al.* 2005].

Initiiert wird diese Reaktionskette durch die Spontankondensation von Succinyl-CoA mit der Aminosäure Glycin im Mitochondrium. Über das Zwischenprodukt α -Amino- β -Keto adipat erfolgt die anschließende Decarboxylierung zu δ -Aminolävulinsäure (ALA). Katalysiert wird dieser Reaktionsschritt, in Abhängigkeit vom Syntheseort, von zwei Enzymen. Der δ -ALA-Synthase-2 in den Erythroblasten des Knochenmarks sowie der δ -ALA-Synthase-1 in der Leber. Die Aktivität dieser beiden Enzyme wird über die Häm-Konzentration im Zytosol durch negative Feedback-Hemmung gesteuert. Diese erste

Reaktionsphase ist demnach als geschwindigkeitsbestimmender Faktor der Synthese des Häms von Bedeutung [Koolman und Röhm 1998].

Nach Verlassen der Mitochondrien führt die asymmetrische Kondensation von zwei Molekülen ALA im Zytoplasma zur Entstehung von Porphobilinogen. Vermittelt wird diese Reaktion von der Porphobilinogen-Synthase, die in diesem Schritt ein Zwischenprodukt hervorbringt, das bereits einen Pyrrol-Ring enthält [Heinemann *et al.* 2008]. Es bildet daher die Vorstufe aller Porphyrine [Doenecke *et al.* 2005].

Im nächsten Schritt erfolgt die Bildung der, für Häm und Porphyrine ganz allgemein typischen, Tetrapyrrol-Struktur durch unmittelbare Vereinigung von 4 Molekülen Porphobilinogen [Königshoff und Brandenburger 2007]. Unter Zusammenwirken der beiden Enzyme Porphobilinogen-Desaminase und Hydroxymethylbilan-Synthase erfolgt zunächst die Abspaltung von 4 NH₂-Gruppen. Durch Bindung des so entstandenen Präuroporphyrinogens an einen weiteren Katalysator, die Uroporphyrinogen III-Synthase, entsteht als nächstes Zwischenprodukt des Häm-Syntheseweges das Uroporphyrinogen III [Heinemann *et al.* 2008].

Nach Decarboxylierung seiner 4 Acetat-Seitenketten zu Methylgruppen durch die Uroporphyrinogen-Decarboxylase entsteht Koproporphyrinogen III. Dieses gelangt über ein Transportermolekül zurück in das Mitochondrium, wo schließlich auch seine Propionatseitenketten zu Vinylresten umgebaut werden [Heinemann *et al.* 2008].

Gewährleistet wird diese Reaktion von der Koproporphyrinogen-Oxidase, die entweder an oder in der Mitochondrien-Membran lokalisiert ist. Das Endprodukt dieses Syntheseschrittes ist Protoporphyrinogen IX. Die finale Seitenkettenkonstellation des späteren Häm-Moleküls ist an dieser Stelle bereits gegeben [Koolmann und Röhm 1998].

Aus Protoporphyrinogen IX wird letztendlich durch Oxidation mittels Protoporphyrinogen-Oxidase das direkte Vorläufermolekül des Häms generiert, das Protoporphyrin IX.

Im Zuge dieser Reaktion erhält das Tetrapyrrol auch seine charakteristische rote Farbe [Heinemann *et al.* 2008].

Die Fertigstellung des Häm-Moleküls erfordert nun noch einen letzten Reaktionsschritt unter Mitwirkung der sogenannten Ferrochelatase. Mit dem Einbau von zweiwertigem Eisen in den Ring und seiner komplexen Bindung an 4 Koordinationsstellen des Protoporphyrins ist die Biosynthese des Häms abgeschlossen. Das entstandene Fe-Protoporphyrin IX [Koolmann und Röhm 1998] oder Protohäm [Heinemann *et al.* 2008], wie das Häm-Molekül auch bezeichnet wird, steht dem Organismus nun zur Bildung der Hämproteine zur Verfügung [Doenecke *et al.* 2005].

Der Großteil des auf diesem Weg synthetisierten Häms wird im menschlichen Organismus für die Synthese des Hämoglobins verwendet. Genau genommen sind es ca. 85% der Syntheseleistung, die für das sauerstofftransportierende Protein und gleichzeitig auch für die farbgebende Komponente des Blutes, genützt werden [Wang *et al.* 2006; Silbernagl und Despopoulos 2003].

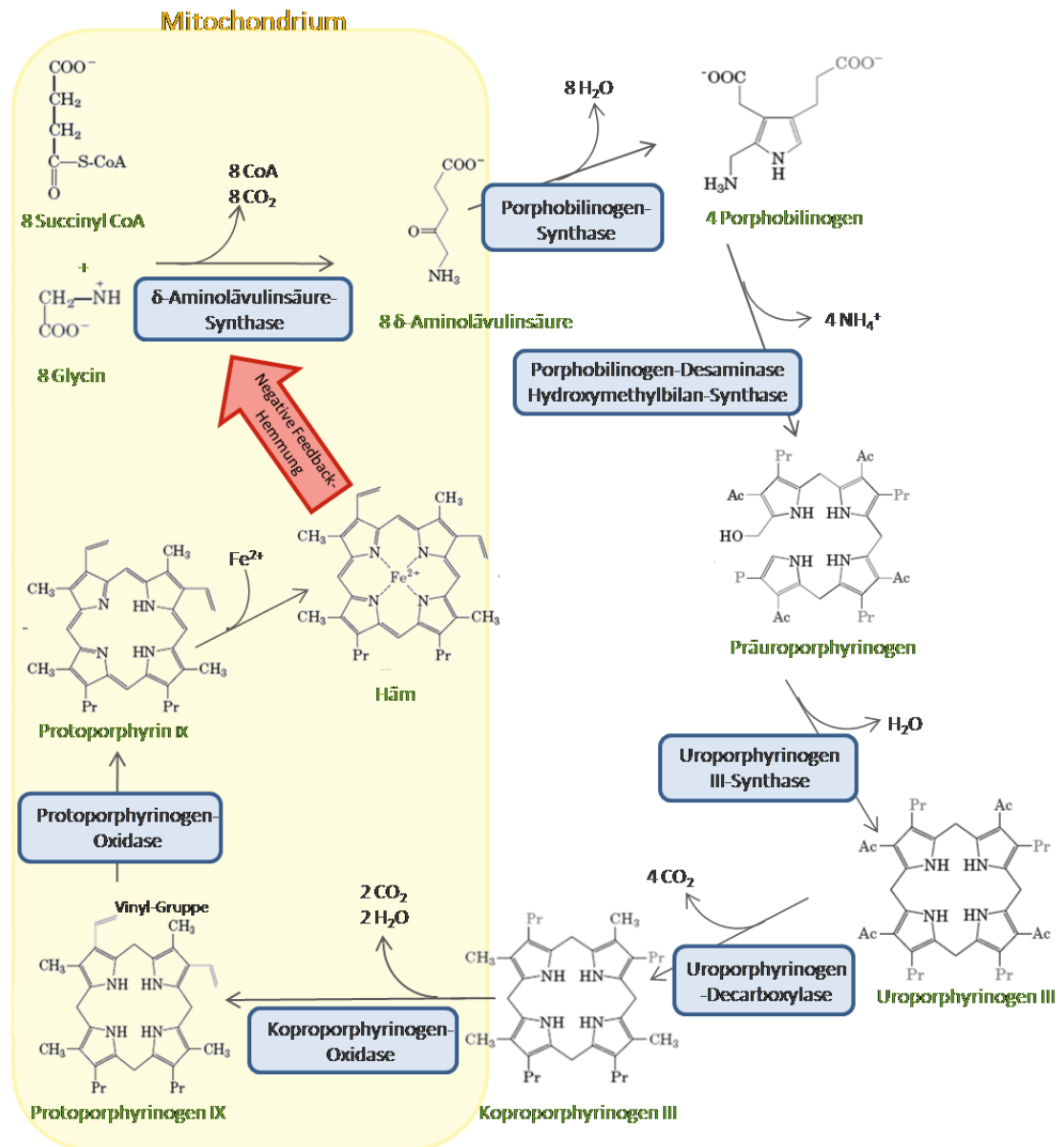


Abb. 6: Biosynthese des Häms aus Succinyl CoA und Glycin. Ac steht für eine Acetyl-Seitenkette ($-\text{CH}_2\text{COO}^-$); Pr steht für eine Propionyl-Seitenkette ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$) [Nelson und Cox 2008; modifiziert nach Königshoff und Brandenburger 2007].

3.3 Häm-Katabolismus

In der Literatur werden jene Stoffwechselwege des Häm-Katabolismus sehr gerne als solche bezeichnet, die Farbe ins Leben wie auch die humane Biochemie bringen [Nelson und Cox 2008]. Die Vielfalt an Farben, die porphyrinogene Zwischenprodukte hervorbringen, kann *in vivo* sehr eindrucksvoll an der Heilung eines Hämatoms beobachtet werden [Koolman und Röhm 1998].

Neben den Hämproteinen Myoglobin, den diversen Cytochromen, Katalasen und Peroxidasen spielt insbesondere das Hämoglobin eine große Rolle. Der überwiegende Teil des synthetisierten Häms im menschlichen Organismus stammt aus dem Abbau alternder Erythrozyten, in welchen es eingebaut ist. Dieser Stoffwechselprozess stellt demnach die ausgiebigste Häm-Quelle dar [Ryter 2012].

Die mittlere Lebensdauer der Erythrozyten beträgt etwa 120 Tage [Battersby 2000]. Seneszente Zellen werden großteils in die Milz aber auch die Leber, Nieren und das Knochenmark transportiert und dort von Makrophagen des retikuloendothelialen Systems abgebaut [Gossauer 1994]. Stündlich erfolgt im menschlichen Körper auf diese Weise der Abbau von ca. 100 – 200 Millionen roter Blutkörperchen [Koolman und Röhm 1998]. Die Eliminierung von 1g Hämoglobin führt so zur Bildung von 35 mg Bilirubin [Löffler *et al.* 2006].

Freies Hämoglobin sowie Häm aus dem Abbau von Methämoglobin zirkulieren im Blut, liegen dort jedoch an Proteine gebunden vor. In dieser Form werden auch diese zur Leber transportiert und durchlaufen dort den üblichen Abbauprozess. Das Schlüsselenzym, die Häm-Oxygenase, wird allerdings auch in allen anderen Körpergeweben exprimiert, sodass der Abbau nicht zwingend in der Leber stattfinden muss. Die lokale Heilung eines Hämatoms stellt auch diesbezüglich wiederum ein anschauliches Beispiel dar [Ryter und Tyrrell 2000].

Zusammengefasst werden kann der Katabolismus des Häms in 3 Phasen, die im Folgenden in eigenen Kapiteln besprochen werden sollen:

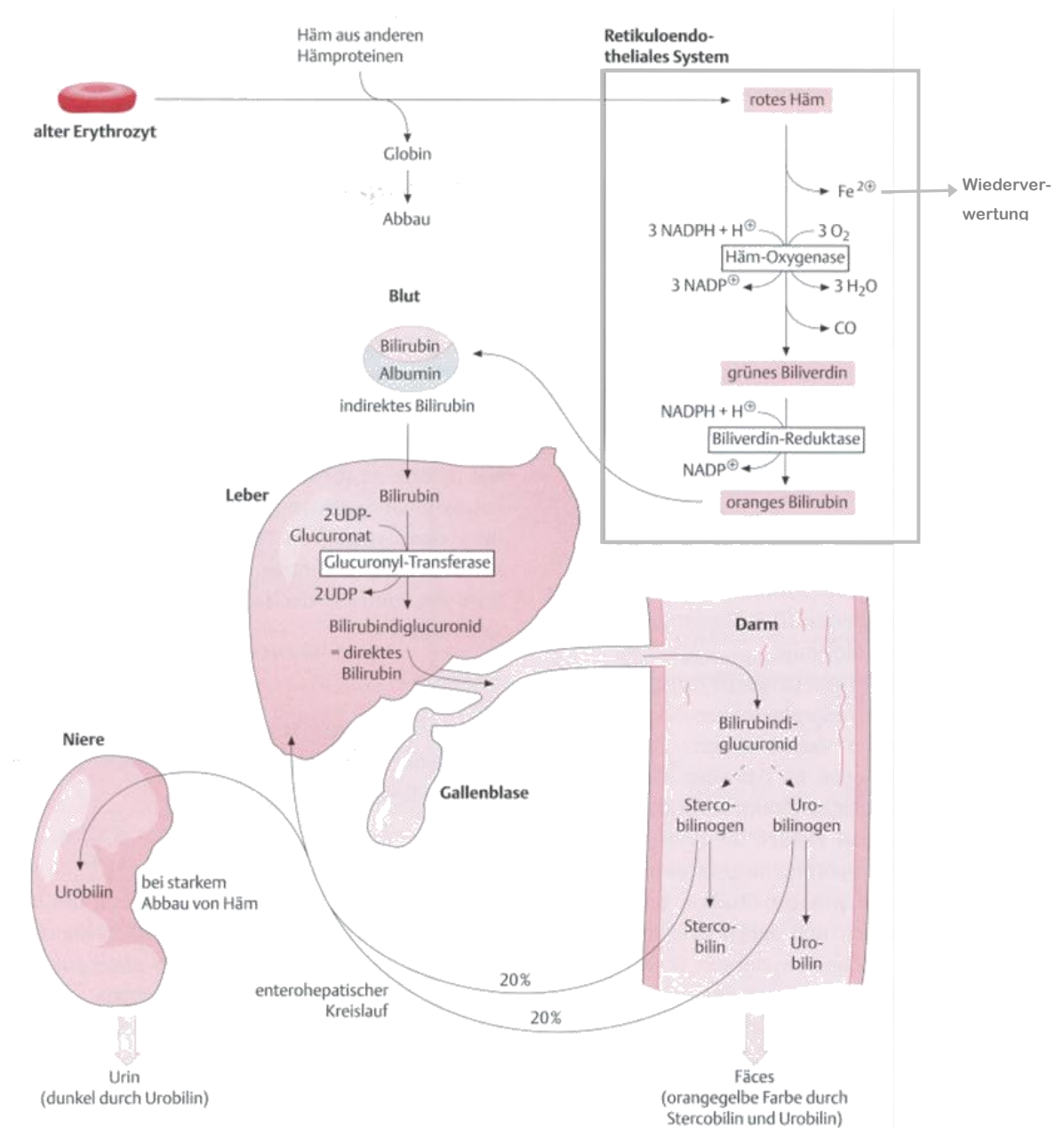


Abb. 7: Katabolismus des Häms. [Königshoff und Brandenburger 2007]

3.3.1 Prähepatische Phase des Hämabbaus

In dieser ersten Reaktionsphase beginnt mit der Abtrennung des Proteinanteils von Hämoglobin der Abbau des rot gefärbten Häms-Moleküls [Koolman und Röhm 1998]. Unter Katalyse der Häm-Oxygenase und der Mitwirkung von Sauerstoff und NADPH erfolgt in einem ersten Reaktionsschritt die oxidative Öffnung des Metalloporphyrin-Ringes selektiv an der α -Methinbrücke. Auf diesem Weg werden Kohlenmonoxid und ein instabiler Fe^{3+} -Komplex frei [Stocker 2004]. Eisen wird zu Ferritin rezykliert das in weiterer Folge für eine neuerliche Biosynthese von Häm zur Verfügung steht [Gossauer 1994].

Das so entstandene grüne Biliverdin IX α wird in einer nächsten Reaktion unter katalytischer Wirkung der sogenannten zytoplasmatischen Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin IX α reduziert. Ein stark lipophiles, rot-orange gefärbtes Stoffwechselprodukt [Löffler *et al.* 2006] mit sowohl physiologischen als auch pathologischen Stoffwechseleigenschaften im menschlichen Organismus [Kapitulnik 2004].

3.3.2 Intrahepatische Phase des Hämabbaus

Die folgenden Schritte des Bilirubinabbaus werden in der Leber fortgeführt. Jene Mengen des Gallenpigments die nicht direkt dort, sondern in anderen Geweben synthetisiert wurden, müssen demnach erst über den Blutweg in die Leber transferiert werden. Die äußerst schlechte Wasserlöslichkeit des Bilirubins erfordert dafür die Bindung an ein Transportprotein, das Albumin. Die Komplexbildung erfolgt in einem molaren Verhältnis Bilirubin zu Albumin von 1:1 [Tomaro und Batlle 2002].

Nach Dissoziation des unkonjugierten Bilirubins von seinem Trägermolekül im sogenannten Dissé-Raum erfolgt die Aufnahme in die Leber. Diese wird durch Diffusion und teilweisen Peptid-Cotransport durch die sinusoidale Oberflächenmembran der Hepatozyten gewährleistet. Um das lipophile Pigment auch im Zytosol der Leber in Lösung

zu halten wird es intrahepatisch an Ligandin bzw. Protein-Z gebunden und ins Endoplasmatische Retikulum (ER) überführt [Kamisako *et al.* 2000].

Hier erfolgt die Konjugierung einer oder gar beider seiner Propionyl-Seitenketten mit Glucuronat (Glucuronsäure, Glucose oder Xylose) [Stocker 2004]. Unter Katalyse der UDP-Glucuronyltransferase wird Bilirubin in sein gut wasserlösliches Derivat Bilirubin Konjugat (Bilirubin Ditaurot) verstoffwechselt [Bulmer *et al.* 2008]. Die Konjugierung stellt jenen nicht vernachlässigbaren Stoffwechselschritt dar, der für die Polarität des Bilirubins und infolgedessen auch für die Möglichkeit seiner Ausscheidung essentiell ist. Einer Akkumulierung des Pigments, dem Erreichen pathologischer Serumkonzentrationen sowie der damit verbundenen Stoffwechselstörungen wird somit entgegenwirkt [Gossauer 1994].

In einer ATP-abhängigen Transportreaktion verlässt dieses Bilirubin Konjugat die Leber entweder in Form eines Mono- oder Diglucuronids und geht unmittelbar in die posthepatische Phase des Hämabbaus über [Löffler *et al.* 2006].

3.3.3 Posthepatische Phase des Hämabbaus

Bilirubin-Konjugat gelangt über den erwähnten aktiven Transport in die Gallenkanälchen und wird so mit der Galle über den Gallengang in den Dünndarm ausgeschieden. Anaerobe Bakterien der intestinalen Flora des Dickdarms bauen dieses schrittweise weiter ab. Sie enthalten β -Glucuronidasen die in erster Instanz die Glucuronatreste abtrennen und so das Pigment dekonjugieren [Bulmer *et al.* 2008]. Über die farblosen Zwischenprodukte Mesobilirubin und in fortgeschrittenerem Stadium Stercobilinogen und Urobilinogen entstehen als Stoffwechselendprodukte Urobilin und Stercobilin [Löffler *et al.* 2006]. Ihre gelblich-orange Farbe ist für die Farbgebung humaner Ausscheidungsprodukte verantwortlich [Koolman und Röhm 1998].

Während Stercobilin mit den Fäzes ausgeschieden wird, verlässt Urobilin als Bestandteil des Urins den menschlichen Organismus. Urobilin resultiert aus einem geringen Teil der im Darm aus Bilirubin entstandenen Metaboliten (ca. 20%), die rückresorbiert und über den enterohepatischen Kreislauf erneut ausgeschieden werden. Eine eher geringe Menge gelangt dabei über das Blut in die Nieren und wird so zu Urobilin verstoffwechselt. Insgesamt werden im menschlichen Organismus täglich annähernd 4mg/kg Körpergewicht Bilirubin gebildet und entsprechend ausgeschieden [Wang *et al.* 2006]. Diese Menge setzt sich wie folgt aus ca. 100-200 mg Stercobilin und durchschnittlich etwa 0,64 mg, jedoch maximal 4 mg/24-h-Urin, Urobilin zusammen [Löffler *et al.* 2006].

Bei Störungen der Leberfunktion bzw. des Hämabbaus können diese Werte je nach dem zu Grunde liegenden Pathomechanismus sowohl erhöht als auch erniedrigt sein [Siegenthaler 1973].

4. Störungen des Tetrapyrrolstoffwechsels

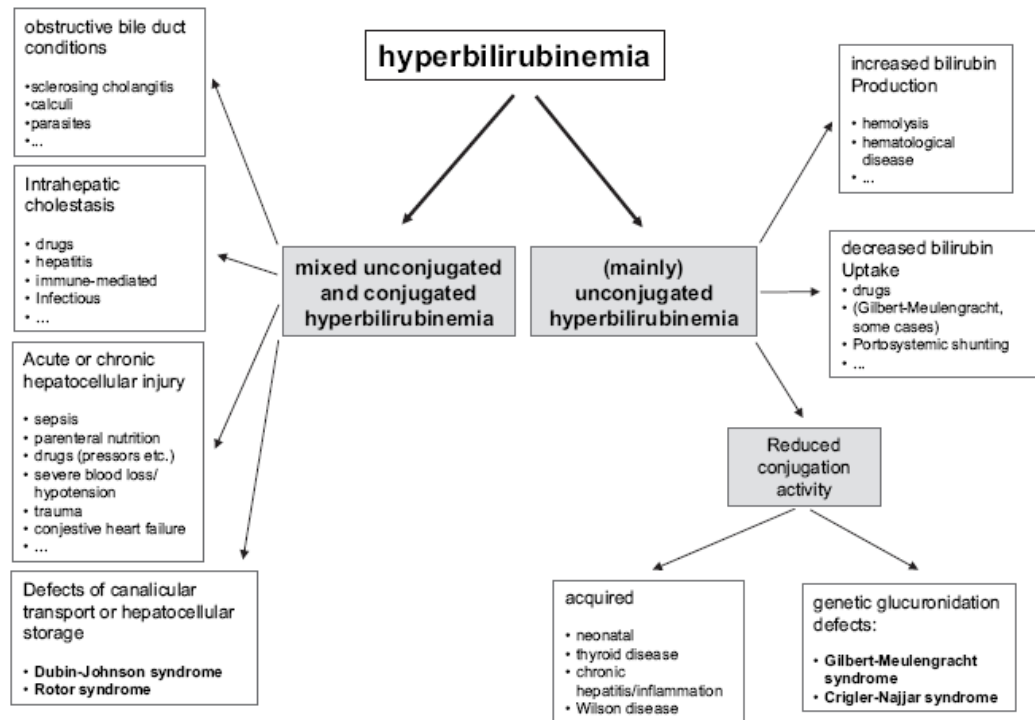


Abb. 8: Diagnostische Kriterien von Hyperbilirubinämien. Die Abbildung gibt einen Überblick über bekannte Hyperbilirubinämien, ihre ursächlichen Faktoren und zu Grunde liegende Pathomechanismen [Strassburg 2010].

4.1 Toxizität pathologisch erhöhter Bilirubinspiegel

Generell werden im erwachsenen menschlichen Organismus Gesamtbilirubinspiegel $>34 \mu\text{mol/l}$ im Plasma als erhöht betrachtet. Eine vermehrte Bildung des Gallenpigments übersteigt die Albuminbindungs- und Ausscheidungskapazität des Stoffwechsels und führt so zu einer Gewebsakkumulierung des Bilirubins. Die Gelbfärbung von Haut und Skleren im Rahmen einer Gelbsucht (=Ikterus) ist die Folge [Löffler *et al.* 2006].

Diese sogenannte Hyperbilirubinämie kann unterschiedlicher Herkunft sein. Entsprechend dem zu Grunde liegenden Pathomechanismus kann diese in eine prä-, intra- und posthepatische unterteilt werden [Wiwanitkit 2007].

Sehr hohe bzw. chronisch erhöhte Konzentrationen des Bilirubins im Plasma vermögen durchaus schwerwiegende Schädigungen im Organismus hervorzurufen. Neben Initiierung einer Zellapoptose in verschiedensten Körpergeweben [Ostrow und Tiribelli 2003] kann eine Hyperbilirubinämie, je nach Schweregrad, akute oder chronische neuronale Dysfunktionen und irreversible Schädigungen des Gehirns mit sich bringen [Bulmer *et al.* 2008a].

4.2 Erworbene Hyperbilirubinämie

Erworbene Hyperbilirubinämien gehen vorwiegend mit dem vermehrten Abbau von Erythrozyten einher. Die erhöhte Hämolyseneigung führt zu einer gesteigerten Bildung von Bilirubin, die letztlich für die Entstehung eines prähepatischen Ikterus verantwortlich ist [Löffler *et al.* 2006]. Ursächlich dafür kann beispielsweise der Abbau von Blutansammlungen und Hämatomen sein. Diese sind grundsätzlich mit einem erhöhten Spiegel des unkonjugierten Bilirubins im Plasma verbunden [Wiwanitkit 2007].

Erhöhte Plasmaspiegel des konjugierten Bilirubins können durch den Verschluss der ableitenden Gallenwege und damit verbundener, gestörter Bilirubinausscheidung bedingt sein (= posthepatischer Ikterus). Intrahepatische Störungen können sowohl durch konjugiertes als auch unkonjugiertes Bilirubin hervorgerufen werden. Diese sind mit einer Fehlfunktion der Bilirubinkonjugation oder –ausscheidung assoziiert. Leberfunktionsstörungen wie beispielsweise eine infektiöse Hepatitis, Alkohol und Wechselwirkungen von Medikamenten spielen dahingehend eine Rolle [Wiwanitkit 2007].

Bekanntester Vertreter dieser Gruppe ist der *Neugeborenenikterus*. Durch verstärkte Hämolyse unmittelbar nach der Geburt und der Unreife des neonatalen Organismus kommt es in den ersten Lebenstagen zu einem physiologischen Ikterus. Die Plasmabilirubinspiegel erreichen Werte von $>200 \mu\text{mol/l}$, wobei sich diese durch stetige Reifung der Abbauprozesse innerhalb einer Woche auf etwa $20 \mu\text{mol/l}$ normalisieren [Kapitulnik 2004; Stevenson und Wong 2010].

Steigt jedoch der Plasmaspiegel auf $>340 \mu\text{mol/l}$ an, resultiert daraus sehr schnell eine pathologische Hyperbilirubinämie mit der Gefahr der Entwicklung einer Bilirubinenzephalopathie (Kernikterus) und damit einhergehenden Entwicklungsbeeinträchtigung und Schädigungen des Gehirns sowie schlimmstenfalls des Todes [Zhou *et al.* 2010].

4.3 Angeborene Hyperbilirubinämien

Entsprechend des Schweregrads, steht an unterster Stelle der „Hierarchie der angeborenen Hyperbilirubinämien“ das sogenannte ***Gilbert's Syndrom (GS)*** oder *Morbus Meulengracht*, wie es auch genannt wird. Ihm liegt eine gestörte Konjugationskapazität des Bilirubins in der Leber zu Grunde. Diese ist auf einen genetischen Defekt in der Promotorregion der UDP-Glucuronyltransferase (UGT1A1) zurückzuführen, die bei Patienten mit GS etwa 30% der physiologischen Aktivität besitzt [Strassburg 2010]. Dieses Krankheitsbild verursacht im Normalfall eine nur leichte Erhöhung des unkonjugierten Bilirubins, meist ohne in Form etwaiger Symptome in Erscheinung zu treten. Die Diagnose erfolgt daher sehr oft per Zufall im Rahmen routinemäßiger Blutuntersuchungen [Radu und Atsmon 2001].

Der Blutplasmaspiegel erreicht dabei im Mittel Konzentrationen zwischen $18 \mu\text{mol/l}$ und $50 \mu\text{mol/l}$ [Burchell und Hume 1999] maximal aber $84 \mu\text{mol/l}$ [Kamisako *et al.* 2000]. Etwa 3-10% der weltweiten Bevölkerung sind von diesem Krankheitsbild betrof-

fen, wobei das Vorkommen bei Männern häufiger zu beobachten ist als bei Frauen [Radu und Atsmon 2001].

Jene milde Hyperbilirubinämie, wie sie im Gilbert's Syndrom beobachtet wird, dürfte im Sinne einer zytoprotektiven Wirkung beinahe schon wieder physiologisch sein. Eine Vielzahl an Arbeiten hat gezeigt, dass moderat erhöhte Bilirubinkonzentrationen im Blut mit einer erniedrigten Prävalenz für kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs assoziiert sein könnten. Diverse Studien konnten diese Hypothese bestätigen [Vitek *et al.* 2002; Bulmer *et al.* 2008b; Horsfall *et al.* 2011]. Auch die Framingham Heart Study konnte diesbezügliche Zusammenhänge beobachten [Strassburg 2010].

Das **Crigler-Najjar-Syndrom** ist dem Gilbert's Syndrom hinsichtlich des zu Grunde liegenden Pathomechanismus ident, jedoch mit wesentlich höheren Blutbilirubinkonzentrationen verbunden. Es werden dahingehend zwei Formen (I und II) unterschieden [Kamisako *et al.* 2000]:

Typ I ist eine extrem seltene autosomal rezessiv vererbte Erkrankung mit mehr oder weniger ausgelöschter UGT1A1-Aktivität (<1%) [Bosma 2003; Strassburg 2010]. Betroffene Patienten sind also nicht in der Lage unkonjugiertes Bilirubin zu konjugieren und auszuscheiden [Zhou *et al.* 2010]. Dementsprechend hoch sind die Plasmakonzentrationen im Blut zwischen 428 µmol/l und 769 µmol/l. Eine Therapie ist in solchen Fällen so gut wie nicht möglich, weshalb betroffene Kinder letztlich an einem Kernikterus versterben [Löffler *et al.* 2006].

Typ II hingegen unterliegt einer autosomal-dominanten Vererbung und kann in die Kategorie der moderaten Hyperbilirubinämien eingeordnet werden. Die Enzymaktivität beträgt etwa 10% seiner physiologischen Norm [Bosma 2003; Strassburg 2010] und bedingt Blutbilirubinkonzentrationen zwischen 85 µmol/l und 339 µmol/l [Kamisako *et al.* 2000]. Entgegen der Tatsache, dass im gesunden Organismus der Großteil des Bili-

rubins als Diglucuronid ausgeschieden wird, stellt bei Crigler-Najjar-Syndrom Typ II das Monoglucuronid das Hauptausscheidungsprodukt dar [Löffler *et al.* 2006].

Der Vollständigkeit halber müssen in diesem Zusammenhang noch zwei weitere Krankheitsbilder erwähnt werden, die in ihrer Erscheinungsform und ihren Eigenschaften sehr ähnlich sind. Das **Dubin Johnson-Syndrom** und das **Rotor-Syndrom** treten eher seltener in Erscheinung und sind bedingt durch Mutationen im MRP2-Gen, welches den Transportmechanismus des Bilirubins durch die Hepatozyten gewährleistet. Infolge dessen, kommt es im Fall des Dubin-Johnson Syndroms zu chronisch erhöhten Plasmaspiegeln sowohl des konjugierten als auch des unkonjugierten Bilirubins. Diese bewegen sich im Bereich zwischen 50 $\mu\text{mol/l}$ und 100 $\mu\text{mol/l}$, können aber durchaus den Wert von 400 $\mu\text{mol/l}$ überschreiten. Wohingegen beim Rotor-Syndrom eine chronische Hyperbilirubinämie lediglich durch die konjugierte Form bedingt ist. Auch diese beiden Syndrome folgen einem autosomal-rezessiven Erbgang [Strassburg 2010].

4.4 Hepatische Porphyrien

Porphyrien bezeichnen Erkrankungen die durch Akkumulierung von Porphyrinen charakterisiert sind. Sie sind bedingt durch teilweise vererbte Enzymdefekte welche die Biosynthese des Häms beeinträchtigen. In Hinblick auf ihre klinischen Symptome unterscheidet man hepatische von erythropoietischen Porphyrien. Während hepatische besonders durch Bauchschmerzen, neuropsychiatrische Symptome und Neuropathien gekennzeichnet sind, erscheinen erythropoietische eher in Form von photosensitivem Hautausschlag. Letztere können zusätzlich mit Schädigungen der Leber und/oder vermehrter Hämolyse assoziiert sein [Simon und Herkes 2011]. Abbildung 9 zeigt bekannte Porphyrien und ihre zu Grunde liegenden Enzymdefekte.

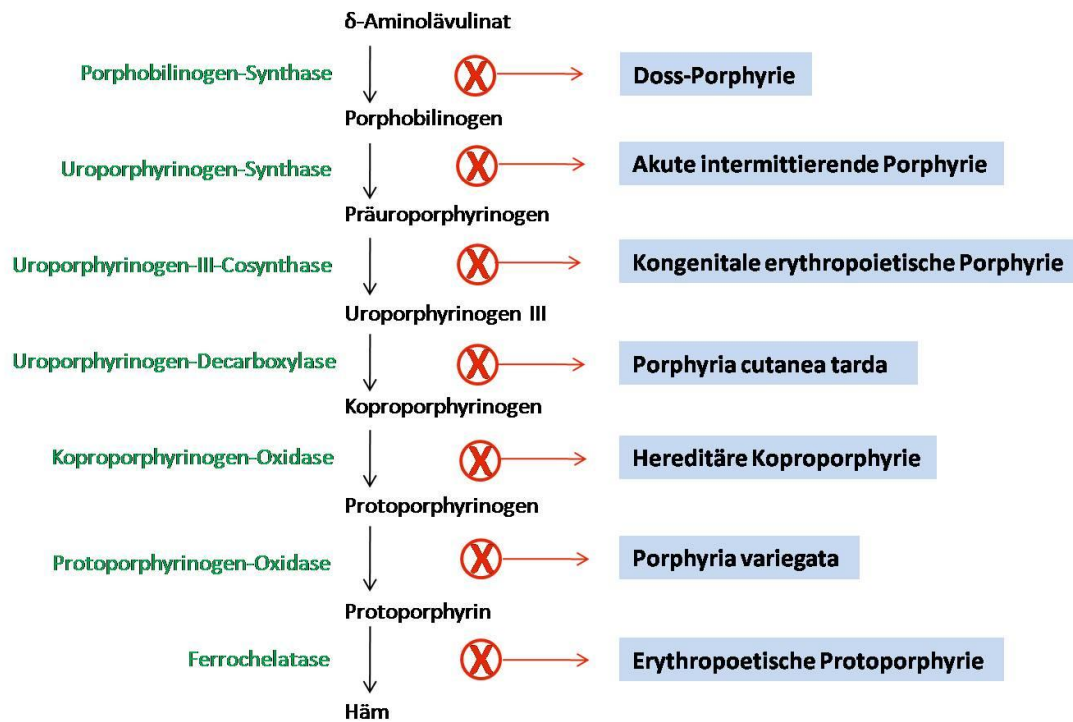


Abb. 9: Hepatische Porphyrien [modifiziert nach Nelson und Cox 2008].

5. Physiologische Bedeutung humaner Tetrapyrrole

In Anbetracht ihrer Vielfalt an physiologischen Eigenschaften wird die Bedeutung humaner Gallenpigmente und ihrer Derivate als Zellprotektor im menschlichen Organismus deutlich. Die verfügbare Literatur berichtet von einer Vielzahl an Assoziationen moderat erhöhter Bilirubinspiegel und ihren positiven Auswirkungen innerhalb diverser Pathomechanismen und Krankheitsbilder. Vítek erwähnt in einem Kommentar im *Pediatrics* beispielhaft nur einige: Herzerkrankungen, Atopische Dermatitis, mentale Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Meningitis. Des Weiteren dürften im umgekehrten Sinn erniedrigte Blutspiegel mit einem erhöhten Risiko insbesondere für jene Erkrankungen verbunden sein, die durch oxidativen Stress bedingt sind [Vítek 2005].

Besondere Bedeutung kommt der Schutzwirkung des Bilirubins im entwickelnden Gehirn von Neugeborenen zu [Nelson und Cox 2008].

5.1 Antioxidatives Potenzial

Oxidativer Stress ist gekennzeichnet durch vermehrte Bildung von freien Radikalen im Organismus. Diese sind in der Lage Schädigungen der DNA sowie im weiteren Sinn von Proteinen und Lipiden hervorzurufen. Demnach spielen sie für die Entstehung stressbedingter Erkrankungen wie Krebs, chronischen Entzündungen, Herzerkrankungen und Infektionen ebenso wie in der Tumorgenese und dem Alterungsprozess eine wichtige Rolle [Betteridge 2000].

Bilirubin ist in unkonjugierter wie auch konjugierter Form das häufigste Antioxidans in Körpergeweben und ist für den größten Teil der oxidationshemmenden Aktivität im Serum verantwortlich [Frei *et al.* 1988; Nelson und Cox 2008]. Es fungiert als physiologischer Peroxylradikal-Fänger und schützt so die Lipidmembranen der Körperzellen vor

oxidativen Angriffen und in weiterer Folge dem Zelltod. Des Weiteren ist (konjugiertes) Bilirubin ebenso in der Lage andere Radikalspezies wie beispielsweise Hypochlorsäure, Quinone, Singulett-O₂ und Nitroxylradikale einzufangen und unschädlich zu machen [Stocker 2004].

In einer *in vitro* Studie an Neuronalzellen von Ratten wurde gezeigt, dass bereits das Vorhandensein einer nanomolaren Konzentration von Bilirubin (10 nM) die Zellen vor einer 10.000-fach höheren Konzentration an Hydrogenperoxiden schützt [Doré *et al.* 1999].

Die erwähnte antiapoptotische Wirkung des Bilirubins wurde in diesem Zusammenhang bereits *in vitro* an Hepatozyten beobachtet. Relevant dürfte diese Eigenschaft *in vivo* bei bestehender Lebererkrankung (z.B.: Cholestase) sein, für die auf Grund gesteigerter Schädigung von Hepatozyten eine erhöhte Apoptoserate typisch ist [Granato *et al.* 2003].

Antioxidative Effekte des Bilirubins sind bereits seit längerer Zeit bekannt. Eine erste Publikation erfolgte im Jahr 1954 von Bernard und Kollegen, die in einer *in vivo* Untersuchung erstmals seine protektive Wirkung für Vitamin A vor Oxidation im Darmlumen entdeckt haben [Bernard *et al.* 1954]. Etwa 20 Jahre später, im Jahr 1987, konnten Stocker und Kollegen *in vitro* das stark antioxidative Potenzial des Bilirubins hinsichtlich einer Schutzwirkung vor Oxidation von Lipiden [Stocker *et al.* 1987a; Frei *et al.* 1988; Neuzil und Stocker 1994; Hulea *et al.* 1995] und Proteinen [Neuzil und Stocker 1993; Minetti *et al.* 1998; Thomas *et al.* 1998], insbesondere des Low Density Lipoprotein (LDL), im menschlichen Körper belegen [Wu *et al.* 1996].

Diese protektive Wirkung kommt sowohl Zellen verschiedenster Körpergewebe zugute, als auch freien Fettsäuren die im Blut, gebunden an Albumin, transportiert werden. Das Transportprotein selbst profitiert dahingehend ebenso von der protektiven Eigenschaft des Bilirubins [Stocker *et al.* 1987b]. Stocker leistete mit dieser Untersuchung

Pionierarbeit auf dem Sektor der physiologischen Bedeutung humaner Gallenpigmente.

Zahlreiche Untersuchungen *in vivo* untermauern bisherige Ergebnisse aus vorliegenden *in vitro* Modellen [Sedlak und Snyder 2004]. Dennery und Kollegen berichten dahingehend von erniedrigten Plasmaspiegeln der Lipidhydroperoxide nach dreitägiger Behandlung mit Sauerstoff ($\geq 95\%$) bei Ratten mit Hyperbilirubinämie verglichen mit ihren „gesunden“ Nachkommen [Dennery *et al.* 1995].

Neben diversen Tierstudien in denen erhöhte Aktivität der Hämoxygenase nach Stressinduktion mittels bestimmter Metallionen [Maines und Kappas 1977], Selen [Reiter und Wendel 1983] oder Sulfhydryl-reaktiver Agentien [Kikuchi und Yoshida 1983] beobachtet wurde, bieten auch Humanstudien indirekte Evidenz für antioxidative Effekte des Bilirubins [Stocker 2004]. Neugeborene stellen dahingehend eine bevorzugte Studienpopulation dar, da sie in den ersten Tagen des Lebens natürlicherweise erhöhte Bilirubinspiegel aufweisen. Wiedemann und Kollegen fanden Korrelationen zwischen Serumbilirubinspiegeln von Neugeborenen und ihrer totalen antioxidativen Kapazität (TAK). Mögliche Rückschlüsse von dieser auf TAK werden diesbezüglich in der Literatur diskutiert [Wiedemann *et al.* 2003].

An Neugeborenen mit Vorliegen von Erkrankungen, die mit vermehrter Radikalproduktion einhergehen, konnte ein geringerer Anstieg des Bilirubins im Plasma als in einer untersuchten Kontrollgruppe beobachtet werden. Zurückzuführen ist diese Beobachtung auf die erhöhte antioxidative Aktivität des Bilirubins um die vermehrte Radikalbildung abzufedern [Benaron und Bowen 1991; Hegyi *et al.* 1994]. Die Literatur berichtet von diesem Phänomen auch bei Erwachsenen im Zusammenhang mit Amyotropher Lateralsklerose (ALS) [Ilzecka und Stelmasiak 2003], Sepsis [Otani *et al.* 2001] – alles Erkrankung mit Beteiligung oxidativer Stressoren – und der Verschlechterung einer atopischen Dermatitis [Tsukahara *et al.* 2003].

Im Zuge des Alterungsprozesses und damit assoziierten Erkrankungen geht ebenso ein vermehrtes Vorhandensein von Radikalen mit geringeren Bilirubinspiegeln einher, was jedoch zum Teil auf eine altersbedingte Aktivitätsminderung der Biliverdin-Reduktase zurückzuführen ist. Kim und Park diskutieren dahingehend eine mögliche Option Bilirubin künftig für Anti-Aging-Produkte und therapeutische Zwecke einzusetzen [Kim und Park 2012].

Als neurologischer Schutzfaktor im Sinne seiner antioxidativen Kapazität könnte Bilirubin auch in Bezug auf neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer eine Rolle spielen [Snyder und Baranano 2001].

5.2 Vasoprotektive Eigenschaften

Basierend auf der antioxidativen Schutzwirkung des Bilirubins auf LDL-Moleküle im menschlichen Organismus, dürfte dieses im weiteren Sinne ein reduziertes Risiko für die Atherogenese darstellen [Wu *et al.* 1996; Bulmer *et al.* 2008b]. Eine Metaanalyse aus 11 inkludierten Studien zeigt dahingehend eindeutige Zusammenhänge der Bilirubinspiegeln und dem Schweregrad einer Atherosklerose bei Männern [Novotny und Vitek 2003].

Schwertner und Kollegen diskutierten 1994 erstmals die Assoziation erhöhter Gesamtbilirubinspiegel mit einem geringeren Risiko für koronare Gefäßerkrankungen. Die Stärke dieser Zusammenhänge ist vergleichbar mit jenen zwischen Rauchen, erhöhtem Blutdruck und HDL-Cholesterin-Werten [Schwertner *et al.* 1994; Hopkins *et al.* 1996; Madhavan *et al.* 1997].

Eine Vielzahl an epidemiologischen Studien untersuchte den Zusammenhang zwischen Bilirubin und kardiovaskulären Erkrankungen und kam übereinstimmend zu dem Ergebnis, dass erhöhte Bilirubinspiegel negativ mit dem Risiko für diverse Krankheitsbil-

der dieser Kategorie assoziiert werden können [Schwertner und Vitek 2008]. So zeigte eine prospektive Studie an knapp 8000 männlichen Briten negative Korrelation mit ischämischen Herzerkrankungen [Breimer *et al.* 1995]. Ergebnisse aus der Framingham Offspring Studie an 4300 Individuen dokumentieren Zusammenhängen in Bezug auf jegliche Art an Kardiovaskulärer Herzerkrankung (Herzerkrankungen aller Art, kongestive Herzinsuffizienz, Schlaganfall) und koronare Todesfälle [Djoussé *et al.* 2001]. Djoussé *et al.* fanden ebensolche Ergebnisse im Zusammenhang mit Myokardinfarkten [Djoussé *et al.* 2003]. Temme berichtet sogar von geringerer, jedoch nicht signifikanter, kardiovaskulärer Mortalität in diesem Kontext [Temme *et al.* 2001].

Diese Beobachtungen wurden vermehrt an Patienten mit Gilbert's Syndrom untersucht. Dieses Krankheitsbild ist auf Grund seiner moderat erhöhten Bilirubinspiegel negativ mit der Prävalenz von koronaren Herzerkrankungen [Hunt *et al.* 2001] und kardiovaskulären Erkrankungen im Allgemeinen assoziiert [Vitek *et al.* 2002; Horsfall *et al.* 2011].

Man hat herausgefunden, dass auch Menschen, die Träger des UGT1A1*28 Allels sind, erhöhte Blutspiegel an Bilirubin aufweisen. Diese Personen könnten demnach gleichermaßen von dieser patho-physiologischen Erscheinung profitieren und einen schützenden Mechanismus gegen koronare Herzerkrankungen in sich tragen [Lin *et al.* 2006; Hunt *et al.* 2001].

Interessanterweise wurden bei Patienten mit beeinträchtigter Glukosetoleranz, Diabetes [Ko *et al.* 1996; Cheriya *et al.* 2010], Übergewicht [Lin *et al.* 2009], Metabolischem Syndrom [Choi *et al.* 2011] und/oder Bluthochdruck [Papadakis *et al.* 1999] – allesamt Pathologien, die sehr eng mit der Entstehung von Atherosklerose assoziiert sind - erniedrigte Bilirubinspiegel im Blut festgestellt. Diese Beobachtung deckt sich in Hinblick auf Hypertonie mit den Ergebnissen einer Untersuchung in der koreanischen Bevölkerung [Chin *et al.* 2009].

5.3 Antiinflammatorisches Potenzial

Gleichermaßen ausgehend von seiner ausgesprochen starken antioxidativen Kapazität, wird Bilirubin auch antiinflammatorische Wirksamkeit zugesprochen. Studien an Ratten belegen seine effektive Wirksamkeit akute sowie chronische Autoimmunerkrankungen zu unterdrücken *in vivo*. Liu und Kollegen konnten diese Eigenschaft an Tieren mit autoimmuner Enzephalomyelitis, dem experimentellen Pendant zu humaner Multipler Sklerose (MS) in Ratten, beobachten. Sogar die Behandlung der Tiere mit Bilirubin unmittelbar nach Auftreten der Erkrankung führte zu einer Unterdrückung der klinischen Symptome [Liu *et al.* 2003; Liu *et al.* 2008].

Eine kürzlich publizierte Humanstudie an MS-Patienten untersuchte Zusammenhänge zwischen Serumbilirubinspiegeln und dieser Erkrankung. Auch die Ergebnisse dieser Untersuchung geben Hinweise auf ein antiinflammatorisches Potenzial des Bilirubins – sowohl in konjugierter als auch unkonjugierter Form. So zeigten MS-Patienten wesentlich niedrigere Serumspiegel als gesunde Kontrollen [Peng *et al.* 2011].

Ein Report der Krankheitsgeschichte eines Patienten mit idiopathischer Pulmonalfibrose und zusätzlich vorliegender Hyperbilirubinämie dokumentiert die wichtige Rolle des Bilirubins im Zuge dieser Erkrankung das Gewebe vor inflammatorischer Schädigung zu schützen. Die Autoren diskutieren dahingehend eine mögliche Schlüsselrolle des Bilirubins in der Therapie von Erkrankungen, die mit entzündlichen Vorgängen im Körper einhergehen. Insbesondere für die Behandlung einer Pulmonalfibrose könnte dies von Relevanz sein [Ohrui *et al.* 2001].

5.4 Antikanzerogene Aktivität

Die Erforschung antikanzerogener Effekte humaner Gallenpigmente und ihrer Derivate ist ein noch relativ junges Gebiet. Dennoch gibt es zum gegenwärtigen Zeitpunkt Hin-

weise auf einen protektiven Effekt erhöhter Bilirubinspiegel in Zusammenhang mit der Kanzerogenese.

In vitro konnte ein antikanzerogener Effekt von Bilirubin durch eine diesbezügliche Behandlung von humanen Kolonkrebszellen beobachtet werden. Durch gezielte Auflösung der mitochondrialen Membran innerhalb der Karzinomzellen bewirkte das Gallenpigment deren Apoptose [Keshavan *et al.* 2004].

Eine Untersuchung von Rao und Kollegen an humanen Leberkrebszellen HepG2 und Magenkrebszellen TMK-1 zeigte ähnliche Ergebnisse, jedoch mit einem offensichtlich 2-seitigen Wirkmechanismus des Bilirubins. In Zusammenhang mit TMK-1-Zellen fungierte es als Prooxidant und induzierte eine Apoptose der Zellen. Bei Einwirken auf HepG2-Zellen hingegen, entfaltete es sein antioxidatives Potenzial und erbrachte somit nicht den erwarteten antikanzerogenen Effekt. Diese Tatsache dürfte möglicherweise durch die Abhängigkeit dieser Wirkung von der beteiligten Zelllinie begründet sein [Rao *et al.* 2006].

Antiproliferative Effekte des Bilirubins konnte *in vitro* an einer Karzinomzelllinie beobachtet werden, die zu einer Entstehung von Brustkrebs führt [Zucker *et al.* 1999].

Eine Assoziation erhöhter Bilirubinspiegel mit dem Risiko für Krebserkrankungen wurde auch bereits *in vivo* evaluiert. Eine 11-jährige Follow-up Studie an 17.000 gesunden Männern ohne vorhandener Krebsanamnese bei Studienbeginn weist dahingehend auf ein geringeres Risiko für Krebserkrankungen bei jenen Personen mit erhöhten Bilirubinspiegeln hin [Wei *et al.* 2000]. Weitere Arbeiten diskutieren selbiges Ergebnis in Hinblick auf Kolonkrebs [Ko *et al.* 1994], Kolorektalkrebs [Zucker *et al.* 2004] und Lungenkrebs [Horsfall *et al.* 2011] im Speziellen.

An einer Kohorte von 10.000 belgischen Männern und Frauen fand man geringere Krebsmortalität (insbesondere Krebsarten die nicht die Lunge betreffen) bei Menschen mit höheren Bilirubinspiegeln im Blut [Temme *et al.* 2001].

Wie eine Bedeutung des UGT1A1*28 Allels bereits schon im Zusammenhang mit der vasoprotektiven Eigenschaft des Bilirubins erwähnt wurde, spielt auch hier sein Vorhandensein eine große Rolle. Träger dieser Ausprägung dürften auch im Kontext mit Krebs ein geringeres Erkrankungsrisiko aufweisen. Umgekehrt, ist das Risiko für Personen mit niedrigen Bilirubinspiegeln entsprechend erhöht [Jirásková *et al.* 2011].

Neben Bilirubin wurden auch in Protoporphyrin, seinem Vorläufermolekül, antikanzerogenes Potenzial, sowie antiproliferative Effekte durch prooxidativ induzierte Apoptose an Zervixkarzinomzellen (HeLa) *in vitro* festgestellt [Koningsberger *et al.* 1995; Zawacka-Pankau *et al.* 2007; Bednarz *et al.* 2007].

Antikanzerogene Effekte *in vitro* bzw. die Anti-Tumor Wirksamkeit *in vivo* konnten bei einer Behandlung humaner Kolonkrebszellen bzw. Mäusen mit Tumoren mit dem Derivat Zink-Protoporphyrin beobachtet werden [Fang *et al.* 2003].

Diese Eigenschaften sowie die zusätzliche Lichtsensibilität dieses Tetrapyrrols werden in der photodynamischen Therapie bestimmter Krebsarten ausgenutzt [Hovhannisyan *et al.* 2005].

5.5 Antimutagenes Potenzial

Gallenpigmente sind in der Lage gentoxische Effekte einer Vielzahl von bekannten Mutagenen zu unterbinden. Von allen weist Bilirubin im *Salmonella Ames Test* das stärkste antimutagene Potenzial auf [Bulmer *et al.* 2007; Mölzer *et al.* 2012]. Diese Eigenschaften konnte *in vitro* bereits im Zusammenhang mit Benzo(α)Pyren [Arimoto *et al.* 1995; Bulmer *et al.* 2007], 2-Nitrofluoren, 1-Nitropyren und 3-Nitrofluoranthren [Tang und Edenharder 1997], 4-Nitroquinolin-1-Oxid und Zigarettenrauch-Kondensaten [Ames *et al.* 1975; De Flora *et al.* 1997], 2,4,7 Trinitrofluorenon und 2-Aminofluoren beobachtet werden. An den letzten beiden Mutagenen wurden auch antimutagene Effekte des Bilirubin Ditaursats entdeckt [Bulmer *et al.* 2007].

Obwohl solche Tests *in vivo* nicht durchgeführt werden können, untermauern sie bisherige Erkenntnisse bezüglich antimutagener und antikanzerogener Eigenschaften humaner Gallenpigmente auf Basis ihrer antioxidativen Fähigkeiten [Bulmer *et al.* 2007].

5.6 Antivirale Eigenschaften

Für antivirale Wirkmechanismen humaner Gallenpigmente gibt keine Evidenz. Dennoch gibt es, mit Vorsicht publiquierte, Hinweise auf ihre Existenz. McPhee und Kollegen beobachteten bereits 1996 *in vitro*, dass Bilirubin in geringen micromolaren Konzentrationen in der Lage ist, die Proteasen des Human Immunodeficiency Virus (HIV) kompetitiv zu hemmen. Tests an einer Zellkultur konnten diese Wirkung zwar nicht bestätigen, zeigten stattdessen jedoch eine weitere: die Hinderung infektiöser viraler Partikel am Eintritt in die kultivierten Zellen [McPhee *et al.* 1996].

Eine kürzlich publizierte Arbeit berichtet von der Eigenschaft des Bilirubins, die Infektivität eines Herpes- (HSV-1) sowie eines Enterovirus (EV71) an inkubierten Hep-2- und Vero-Zellen herabzusetzen. Des Weiteren vermag Bilirubin die virale Replikation zu hemmen. Diese Erkenntnisse bringen zwar nur indirekte klinische Evidenz hervor, könnten jedoch bei Vorliegen einer Hyperbilirubinämie eine mögliche protektive Rolle im Zusammenhang mit viralen Erkrankungen spielen [Santangelo *et al.* 2012].

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Studiendesign

Die vorliegende Arbeit repräsentiert eine Teilstudie eines internationalen Projekt's mit dem Titel „*The Physiological Relevance of Bile Pigments*“. Es handelt sich um eine *in vitro* Untersuchung antikanzero gener Effekte ausgewählter physiologischer Tetrapyrrole an der humanen Leberkrebszelllinie HepG2.

Die experimentelle Bestimmung erfolgte anhand der Evaluierung induzierter DNA-Schädigungen an der Zellkultur. Die Tetrapyrrole Bilirubin IX α , Bilirubin Ditaurat, Bilirubin Dimethylester und Protoporphyrin IX wurden dahingehend in drei physiologischen Konzentrationen (0,5 μ M, 5 μ M, 17 μ M) gegen eine Positiv- (*t*-BOOH) sowie eine Negativkontrolle getestet. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit einem Prooxidans (*t*-BOOH) gestresst.

Nach 24-stündiger Tetrapyrrol-Inkubation der Zellkultur wurden DNA-Schäden mittels Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)-Verfahren (Comet Assay) quantitativ erfasst und als prozentueller Anteil der „tail-DNA“ dokumentiert. Alle Tests wurden in Doppelbestimmung durchgeführt.

2. Vortestphase

Eine Vortestphase diente der Optimierung diverser Arbeitsvorgänge im Zusammenhang mit der Zellkultur und experimentellen Durchführung sowie der Ermittlung einer adäquaten Konzentration des verwendeten Prooxidans (*t*-BOOH). In einer annäherungsweise experimentellen Analyse wurde jene Konzentration (300 μ M) des *t*-BOOH ermittelt, die quantitativ signifikante DNA-Schädigungen an den Krebszellen verglichen zur Negativkontrolle, verursachte und so seine Verwendung im Sinne einer Positivkontrolle gewährleistete.

3. Verwendete Materialien und Laborausrüstung

3.1 HepG2- Zellproben

Für die experimentellen Bestimmungen wurden Leberkrebszellen der Zelllinie HepG2 (human hepatocarcinoma cells) verwendet. Diese stammten aus der Zellbank der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ)*. Die Zellprobe wurde ursprünglich 1975 aus dem Tumorgewebe eines 15-jährigen argentinischen Jungen isoliert [Aden *et al.* 1979]. Die Liefereinheit der Probe entstammte dem Passagedurchgang mit der Nummer 90. Nach Auftauen der Zellen wurden diese 4 Wochen lang bis zur Konfluenz kultiviert, ehe sie in die Testphase übernommen wurden.

HepG2 sind flache, epithelähnliche, adhärent wachsende Zellen mit einer durchschnittlichen Größe von 12 - 19 μm [Ballet *et al.* 1984]. Diese Zelllinie ist physiologischen Hepatozyten im menschlichen Organismus noch sehr ähnlich und besitzt deshalb viele ihrer Funktionen. HepG2-Zellen sind demnach in der Lage eine Reihe verschiedenster humaner Proteine wie beispielsweise Albumin, α -Fetoprotein und unterschiedliche Apolipoproteine zu bilden [Knowels *et al.* 1980]. Des Weiteren besitzen sie *in vitro*, bei Vorhandensein ausreichender Mengen an Glukose im Nährmedium, die Fähigkeit Glykogen zu synthetisieren [Bouma *et al.* 1989].

Auf Grund ihrer besonders guten Wachstumseigenschaften und die Verfügbarkeit über Phase I und II-Enzyme, die üblicherweise bei der Kultivierung *in vitro* verloren gehen, eignen sich HepG2-Zellen besonders gut für Zyto- und Genotoxizitätstests [Uhl *et al.* 2000; Shear *et al.* 1995].

3.2 Chemikalien

Reagens	Hersteller	Produktcode
Accutasesolution	Sigma Life Science	A6964
DMSO: Dimethylsulfoxide	Sigma Life Science	D4540
Dulbecco's PBS without $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$	PAA – The Cell Culture Company	H15-002
Ethanol	VWR International	070205
Ethylendiaminetetraaceticacid (EDTA)	Sigma Life Science	E6758
Fetal Bovine Serum	PAA – The Cell Culture Company	A15-101
MEM with Earl's Salts with L-Glutamine	PAA – The Cell Culture Company	E15-825
Penicillin – Streptomycin	Sigma Life Science	P4333
Sodiumhydroxidepellets	SIGMA-ALDRICH	1310-73-2
Sodiumpyruvate	Sigma Life Science	S8636
Tert-Butyl hydroperoxid	Merck	S4990706811
Triton X-100	Sigma Life Science	X100
Trizma base	Sigma Life Science	93350
Trypan Blue Stain 0,4%	invitrogen	761 866
Ultra Pure LMP Agarose	invitrogen	16520-050
Ultra Pure Agarose	invitrogen	16500-100

Tab. 1: Chemikalien. Auflistung aller im Zuge der Experimente verwendeten Chemikalien.

3.3 Tetrapyrrole

Pigment	Hersteller	Produktcode
Bilirubin (alpha)	Frontier Scientific	L1010-3777
Bilirubin Konjugat (Ditaurat)	Frontier Scientific	JH10-3486
Bilirubin Dimethylester	Frontier Scientific	41488
Protoporphyrin IX	Frontier Scientific	LY09-1626

Tab. 2: Tetrapyrrole. Auflistung der mittels Comet Assay untersuchten Tetrapyrrole.

3.4 Laborzubehör

Material	Hersteller	Produktcode
6 well with Lid well	IWAKI	3810-006
Cell Scrapers	PAA - The Cell Culture Company	PAA90020X
ConicalCentrifugeTubes 15ml	PAA - The Cell Culture Company	PAA50015
ConicalCentrifugeTubes 50ml	PAA - The Cell Culture Company	PAA50050
Deckgläser (20x20mm)	VWR	631-1568
Latexhandschuhe	MICROFLEX	D3578
Micro Centrifuge Tubes for high G-force	VWR	211-0016
Micro Centrifuge Tubes1,5ml Natural Flat Cap	STARLAB	S1615-5500
Nitrilhandschuhe	MICROFLEX	D6319
Objektträger	Assistent	2406/1
Pasteurpipetten	Assistent	567/2
Pasteurpipetten Plastik	Brand	7477 60
Polystyrene Round-Bottom Tube 5ml	FALCON	352058
Reaktionsgefäße 0,6mlfarblos	Biozym Scientific GmbH	710300
Universal blue tips	VWR	612-5756
Universal yellow tips	VWR	612-5755

Tab. 3: Laborzubehör. Auflistung aller verwendeten Laborutensilien und Hilfsmittel.

3.5 Labortechnik und verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Produktcode
Countess automated cell counter	Invitrogen	C10227
Elektrophoresekammer	VWR	730-1796
Elektrophoresis Power Supply	peqLab	EV231P

Fluoreszenzmikroskop	ZEISS	038-03241
CO ₂ Inkubator	Heraeus INSTRUMENTS	95106058
Mikroskop	Hund WILVERTS	1018306
Mikrowelle	Elta	17MX51
pH-Meter	Metrohm	1827001025358
Ultraschallbad TYP RK100	Bandelin electronic	100063
Vortex	Heidolph	89447364
Waage Type AT201	METTLER	L44443
Wärmeplatte MR 3001K	Heidolph	109409439
Wasserbad	Müller-Schlerr	10673994e

Tab. 4: Labortechnik und Geräte. Auflistung der verwendeten technischen Geräte sowie sämtlicher Labortechnik.

4. Herstellung der benötigten Lösungen und Reagenzien

4.1 Nährmedium zur Kultivierung der Zellen

Zusatzstoffe für 500 ml Medium:

50 ml	FBS
5 ml	nicht essentielle Aminosäuren
5 ml	Antibiotikum mit Neomycin
1 ml	Natriumpyruvat
1 ml	L-Glutamin

Als Basis des Nährmediums für Leberkrebszellen HepG2 wurde sogenanntes MEM (Minimum Essential Medium) verwendet. Für optimale Wachstums- und Vermehrungsbedingungen der Zellen musste diese Nährlösung durch die oben angeführten Zusatzstoffe in den entsprechenden Mengen ergänzt werden. MEM-Medium ist üblicherweise in 500 ml Einheiten verfügbar, es mussten daher vor Zugabe der Zusätze 50 ml entnommen werden.

Gut verschlossen, konnte das Nährmedium im Kühlschrank 2-3 Wochen gelagert werden. Sein Gebrauch erforderte jedenfalls sterile Bedingungen und eine Erwärmung auf 37°C. Bei Auftreten von Trübungen und/oder Farbveränderungen war keine Verwendung mehr möglich.

4.2 Stocklösungen der Gallenpigmente

Pigmentmenge für 200 µl Stocklösung (17mM):

2,01 mg	Bilirubin
---------	-----------

2,1 mg	Bilirubin Ditaurat
2,08 mg	Bilirubin Dimethylester
1,91 mg	Protoporphyrin

Die Lösung der kristallinen Tetrapyrrole in 200 µl DMSO bedurfte auf Grund ihrer lipophilen Eigenschaften einer Kombination aus 3 Homogenierungsschritten – das Mischen am Vortex, 5-minütige Erwärmung im 37°C heißen Wasserbad und schließlich noch 3-minütige Inkubation im Ultraschallbad. Gegebenenfalls war dieser Vorgang bis zur vollständigen Lösung der Substanz 2-3 Mal zu wiederholen.

Die Pigment-Stocklösungen sind nicht lagerfähig und mussten daher unmittelbar vor Gebrauch frisch zubereitet werden. Sie wurden jeweils in einer Konzentration von 17 mM hergestellt. Alle weiteren Konzentrationen wurden aus diesen Lösungen verdünnt (Tab.: 5). Ihre Lichtsensibilität erforderte die Durchführung aller Arbeitsschritte im Dunkeln.

Stocklösung	Konzentration	DMSO
1	17 mM	200 µl + Einwaage BR/BRDT/BDME/PRO
2	5 mM	141 µl + 59 µl Stocklösung 1
3	0,5 mM	180 µl + 20 µl Stocklösung 2

Tab. 5: Verdünnungsschema der Tetrapyrrol-Stocklösungen. Die Herstellung der drei Tetrapyrrol-Stocklösungen erfolgt nach dem dargestellten Verdünnungsschema. Stocklösung 2 und 3 werden aus Lösung 1 verdünnt.

4.3 Agarosegele

Im Zuge der Experimente wurden zwei Agarosegele verwendet, die sich in Hinblick auf ihren Schmelzpunkt unterscheiden. *Normal Melting Agarose (NMA)*, die ausschließlich als Trägerschicht auf Objektträgern verwendet wurde (siehe Kapitel 6.3 *Beschichtung der Objektträger*) sowie *Low Melting Agarose (LMA)*, die der Einbettung und Fixierung

der Zellen auf diesen Objektträgern diene (siehe Kapitel 7.1 *Auftragen der Zellsuspension*).

Die Herstellung einer 1 %-igen Lösung erfolgte durch Aufkochen von 800 mg des jeweiligen Agarosepulvers mit 80 ml destilliertem Wasser in einem Becherglas (100 ml). Die klare Lösung war im Kühlschrank gut abgedichtet einige Wochen haltbar. Um ihre Gelierfähigkeit zu behalten, sollte diese jedoch nicht öfter als 3-4 Mal aufgekocht und verwendet werden.

4.4 Lösungen und Reagenzien für den Comet Assay-Test

Tertiärbutylhydroperoxid (*t*-BOOH) – Stresslösung

Teritärbutylhydroperoxid ist ein starkes Oxidationsmittel, das in der Lage ist die DNA von Zellen erheblich zu schädigen. Bereits das Einatmen dieser leicht flüchtigen Substanz kann zu Verätzungen der Schleimhäute von Luft- und Atemwegen sowie der Augen führen. Die oxidative Eigenschaft des *t*-BOOH wurde in der vorliegenden Arbeit ausgenutzt um die Krebszellen zu stressen und so Schädigungen ihrer DNA hervorzurufen (siehe Kapitel 7.2 *Zellstressung*). Im Sinne einer Positivkontrolle sollte diese eine Vergleichsvariable für alle weiteren Proben bieten.

Chemikalien für 250 µl Stocklösung (300 mM):

9,7 µl *t*-BOOH
240,3 µl destilliertes Wasser

Von 100 µl der *t*-BOOH-Stocklösung aus oben genannten Reagenzien wurde unmittelbar vor Gebrauch mit 100 ml destilliertem Wasser eine 300 µM Stresslösung hergestellt. Die Glaskammer in der sich die Lösung befand, musste jedenfalls mit einem De-

ckel verschlossen werden. Die Stocklösung selbst war im Kühlschrank längstens eine Woche haltbar.

Lyselösung

Chemikalien für 2 Liter Lösung:

292,2 g 2,5 M NaCl
58,4 g 0,1 M Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA)
2,422 g 10 mM Trizma base (Tris)
ca. 40 ml 10 M NaOH-Lösung
2 ml Triton X-100
destilliertes Wasser

Für die Herstellung der Lyselösung war es wichtig eine Reihenfolge bei der Zugabe der Reagenzien zu beachten. EDTA und 30 ml des NaOH durften erst nach Vermengen des NaCl und Tris mit ca. 1 Liter destilliertem Wasser zugegeben werden.

Die verbleibende NaOH-Lösung wurde anschließend für die Einstellung des pH-Werts durch tröpfchenweise Zugabe am Magnetrührer verwendet. Dieser musste exakt 10 betragen. In einem abschließenden Schritt musste die Lösung in einen Messkolben (2000 ml) überführt und bis zur Markierung mit destilliertem Wasser aufgefüllt werden. Bei Lagerung in dunklen Flaschen war diese, dennoch unfertige, Lösung im Kühlschrank mehrere Wochen haltbar.

Die Fertigstellung durfte erst unmittelbar vor Gebrauch erfolgen. 200 ml dieser Lyselösung wurden dann unter Rühren mit 2 ml Triton X-100 versetzt. Die Lösung konnte verwendet werden sobald sie klar geworden war.

Elektrophoreselösung

Chemikalien für 2 Liter Lösung:

24 g 0,3 M NaOH

0,58 g 0,001 M Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA)

destilliertes Wasser

Nach vollständigem Lösen der angeführten Reagenzien in 1 Liter destilliertem Wasser erfolgte die Überprüfung des pH-Werts. Dieser sollte jedenfalls größer als 13 sein, konnte jedoch gegebenenfalls durch vorsichtige Zugabe von NaOH modifiziert werden. Auch diese Lösung wurde abschließend in einen Messkolben (2000 ml) überführt und mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Die Elektrophoreselösung war grundsätzlich etwa eine Woche haltbar, wurde jedoch erst einen Tag vor Versuchsdurchlauf – in jedem Fall immer zur gleichen Zeit – frisch zubereitet. Die Lösung musste bei Verwendung kühl sein, es empfahl sich daher eine Aufbewahrung im Kühlschrank.

Neutralisationspuffer

Chemikalien für 1 Liter Lösung:

48,44 g 0,4 M Trizma base (Triz)

ca. 45 ml 37%ige HCl

destilliertes Wasser

Der Neutralisationspuffer wurde durch Vermengen der angeführten Chemikalien in ca. 800 ml destilliertem Wasser hergestellt. Der pH-Wert dieser Lösung muss exakt 7,5 betragen, was einer vorsichtigen Verdünnung mit HCl bedurfte. Anschließende Ergän-

zung von destilliertem Wasser in einem Messkolben (1000 ml) beendete die Fertigung der Lösung.

Bei Lagerung in einem dunklen Behälter war der Neutralisationspuffer im Kühlschrank mehrere Wochen haltbar.

4.5 Ethidiumbromid-Fluoreszenzfarbreagens

Ethidiumbromid ist eine toxische Substanz mit der Eigenschaft sich in die DNA einzulagern und dadurch zu schädigen. Die Zubereitung eines Fluoreszenzfarbreagens daraus erforderte daher das Tragen von Handschuhen und Schutzbrille sowie eines, ausschließlich für diesen Zweck vorgesehenen Schutzmantels. Des Weiteren durfte diese ausschließlich unter einem chemischen Abzug vorgenommen werden.

10 µl Ethidiumbromid-Stocklösung (10 mg/ml) wurden dahingehend in die Vorlage von 5 ml destilliertem Wasser in einem gut verschließbaren Fläschchen überführt. Die fertige Lösung hatte eine Konzentration von 20 µg/ml. Ihre Lagerung musste in einem, speziell für toxische Substanzen vorgesehen, Kühlschrank erfolgen. Dort war das Farbreagens einige Monate haltbar.

5. Zellkultur

Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag	Samstag	Sonntag
Zellpassage	Medien- wechsel	Zellpassage	Medien- wechsel	Zellpassage	Ruhepause	

Tab. 6: Zellkulturzyklus. Die Kultivierung der Zellen erfordert regelmäßige Zellpassage sowie Erneuerung des Nährmediums. Diese Schritte erfolgen in einem festgelegten Zyklus können jedoch bei Veränderungen im Stoffwechsel und der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen eine Verschiebung erfordern.

Für optimale Wachstums- und Vermehrungsbedingungen der HepG2-Zellkultur ist eine Aufbewahrung im Inkubationsschrank bei konstanten Bedingungen von 37°C und 5 % CO₂ erforderlich. Ein ständiger Überblick über den Zustand der Zellen sowie die Kontrolle etwaiger Veränderungen sind wichtige Grundvoraussetzungen für ihre Kultivierung. Ebenso wie eine regelmäßige Zellkulturpflege, die im Detail in Tabelle 6 dargestellt ist.

Der Umgang und die Arbeit mit Zellen in Kultur erforderten stets keimfreie Bedingungen. Sämtliche Arbeitsschritte wurden daher unter der Sterilbank (Abb. 10) durchgeführt. Die verwendeten Laborutensilien, die notwendigen Reagenzien sowie die Zellfläschchen selbst mussten vor jeder Verwendung nach Möglichkeit sterilisiert oder mit Alkohol desinfiziert werden. Gleichmaßen waren Hände bzw. Handschuhe nach jedem Kontakt mit der Umgebung so gut wie möglich keimfrei zu machen.

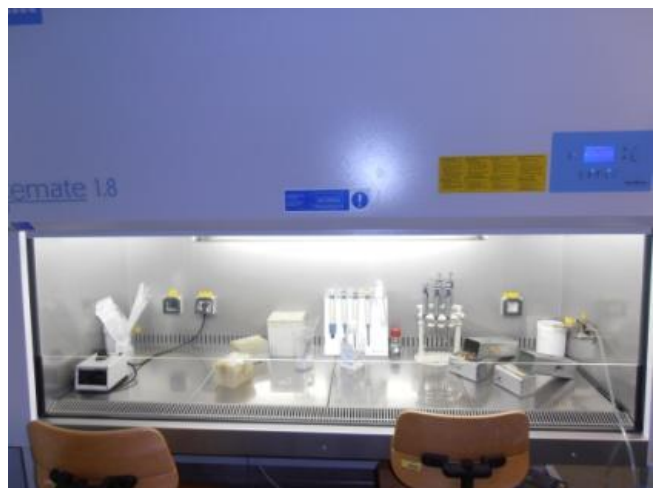


Abb. 10: Sterilbank. Die Sicherheitswerkbank für die Arbeit mit Zellkulturen bietet durch ihr Gehäuse und ausreichende Belüftung Schutz vor Kontaminationen sowie dem Ausdringen von Mikroorganismen.

5.1 Zellen auftauen

Die Konservierung von Zellen erfolgt üblicherweise tiefgefroren in Cryocups. Für eine Kultivierung mussten diese daher aufgetaut werden. Nach „Herauswaschen“ des Gefrierschutzmittels (DMSO) durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 600 RPM und anschließendem Spülen mit 2 ml PBS konnten die Zellen, entsprechend einer gewünschten Zellzahl, in Nährmedium resuspendiert werden. Diese Zellsuspension wurde dann in einer Kulturflasche (40 ml) in einer Vorlage von 8 ml Nährmedium ausgesät.

5.2 Kryokonservierung (Zellen einfrieren)

Die Vorbereitung der Zellen zum Einfrieren, erfolgte im Anschluss an eine Zellpassage. Die Zellsuspension wurde dazu in eine Zellkulturflasche ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Entsprechend den Arbeitsschritten einer Zellpassage wurden die Zellen erst mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 4 ml Akkutase-Enzymlösung bzw. 8 ml Nährmedium abgelöst (siehe Kapitel 5.4 *Zellpassage*).

Pro Zelleinheit die konserviert werden sollte, wurden dem abzentrifugierten Zellpellet 5 ml PBS zu zugefügt. 5 ml der Zellsuspension konnten so in einer Vorlage von 400 µl FBS im Cryocup eingefroren werden. Eine kurzfristige Lagerung erfolgte bei einer Temperatur von -80°C, für längere Konservierung (Monate bis Jahre) wurde die Suspension in flüssigem N₂ bei -196°C eingefroren.

5.3 Medienwechsel („Zellen füttern“)

Die Nährstoffreserven des Nährmediums sind, in Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Zellzyklus, nach ca. 24 – 48h nahezu aufgebraucht. Um Wachstum und Ver-



Abb. 11: Zellkulturfläschchen. Am Boden des Kulturfläschchens befindet sich der Zellrasen, der von Nährmedium (rosa Flüssigkeit) umgeben ist. Die Zellkultur ist eindeutig mit Namen der Zelllinie und Passagezahl gekennzeichnet (Oberkante des Fläschchens).

mehrung der Zellen aufrecht zu erhalten musste demnach täglich ein Medienwechsel erfolgen.

Dazu wurde das alte, nährstoffarme Medium aus dem Kulturfläschchen abgesaugt und durch 8 ml frisches ersetzt. Das Nährmedium sollte bei Zugabe zu den Zellen warm sein und musste daher vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt werden.

5.4 Zellpassage

Durch stetiges Wachstum der Zellen nähern sich die Zellinseln mit der Zeit einander an. Um einem Absterben der Zellkultur aufgrund von Platzmangel entgegenzuwirken, ist die Passage (Überführung) eines Zellaliquots in ein neues Fläschchen erforderlich.

Dafür wurden die Zellen nach Entfernung des alten, verbrauchten Mediums durch Zugabe von 2 ml PBS gewaschen und anschließend an das Absaugen der Waschlösung, für 5 Minuten mit 1 ml einer Akkutase Enzymlösung bei 37°C inkubiert. Die Ablösung vom Fläschchenboden erfolgte durch vorsichtiges Klopfen bzw. Spülen mit 4 ml Medium. Nach Bestimmung der Zellzahl (siehe Kapitel 5.5 *Bestimmung der Zellzahl*) wurde jene Menge der Suspension, die ca. 1 Million Zellen beinhaltete in eine neues Fläschchen mit Vorlage von 8 ml Nährmedium ausgesät.

5.5 Bestimmung der Zellzahl (Trypanblau-Test)

Die Zellzahl der Probe wurde mit einem automatisierten Zählgerät, der sogenannten Countess®, gemessen. Dazu wurden 20 µl der zu messenden Zellsuspension in einem Cup mit 20 µl Trypanblau-Farbstoff vermischt und in einen, speziell für die Countess hergestellten, Objektträger eingebracht. Die Messung lieferte einen Wert für die Anzahl an lebenden Zellen in der Probe („Cells live“), aus dem der Verdünnungsfaktor für eine gewünschte Zellmenge in der Suspension errechnet werden konnte.



Abb. 12: Countess. Die zu bestimmende Probe wird mittels Objektträger in die dafür vorgesehene Öffnung (siehe mittig der roten Begrenzung) gesteckt. Das Ergebnis kann anschließend am Display abgelesen werden.

6. Testvorbereitung

Die folgenden Arbeitsschritte beziehen sich auf die Vorbereitung der Hep-G2-Zellen für den Comet Assay-Test. Diese erfolgte an drei aufeinander folgenden Tagen, wobei Tag 3 gleichzeitig Testtag und Beginn des nächsten Vorbereitungszyklus war (Tab. 7).

Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag
Zellen aussäen	Tetrapyrrol-Inkubation	Comet Assay-Test		
		Zellen aussäen	Tetrapyrrol-Inkubation	Comet Assay-Test

Tab. 7: Testzyklus. Die Darstellung zeigt die wöchentliche Abfolge der Zellvorbereitung für den folgenden Comet Assay-Test. Dieser Zyklus wurde während der Dauer der Testreihe exakt eingehalten.

6.1 Zellen aussäen



Abb. 13: Well-Platte mit 6 Vertiefungen. In den Wells befinden sich die Zellen, umgeben von Nährmedium. Entsprechend der Beschriftung wurden sie darin mit Tetrapyrrol-Lösungen inkubiert.

Das Aussäen der Zellen in einer 6-Well-Platte erfolgte immer montags und mittwochs im Anschluss an die Zellpassage.

Die 4 Vertiefungen (Wells) wurden dazu mit je 3 ml Nährmedium sowie einer Suspension aus ca. 300.000 Zellen befüllt. Verschluss mit einem Deckel mussten die Zellen im Inkubator 24 Stunden anwachsen ehe weitere Vorbereitungen folgen konnten.

6.2 Tetrapyrrol-Inkubation

Nach Ablauf dieser 24 Stunden folgte die Inkubation der Zellen mit einem der zu testenden Tetrapyrrole. In einem ersten Schritt erfolgte die Verdünnung der Stocklösungen mit den Konzentrationen 17 mM, 5 mM und 0,5 mM. Dazu wurden je 4,5 µl der 3 Konzentrationen in jeweils dafür vorbereitete Röhrchen mit 4,5 ml Medium überführt und gemischt. Für eine Negativkontrolle wurde dieselbe Menge DMSO an Stelle der Tetrapyrrol-Lösung verwendet. Das „alte“ Medium in den Vertiefungen der 6-Well-Platte wurde anschließend durch die Lösungen ersetzt. Die Inkubationszeit im Inkubator betrug exakt 24 Stunden und bedingte den Beginn der Probenaufbereitung pünktlich nach Ablauf dieser Zeit.

Auf Grund der Lichtsensibilität der Tetrapyrrole wurden die genannten Arbeitsschritte im Dunkeln durchgeführt.

Konzentration der Stocklösung	Finale Konzentration/Well
17 mM	17 µM
5 mM	5 µM
0,5 mM	0,5 µM

Tab. 8: Finale Konzentration der Inkubationslösung. Aus der Verdünnung der Tetrapyrrol-Stocklösungen um eine Faktor 1000 resultiert eine finale Konzentration der Inkubationslösung im µM-Bereich.

6.3 Beschichtung der Objektträger

Beschichtete Objektträger stellen in ihrer Funktion als Trägermaterial der Zellgele ein unverzichtbares Zubehör für den Comet Assay-Test dar. Ihre Herstellung benötigte

Normal Melting Agarose (NMA)-Lösung, die in der Mikrowelle aufgeköcht und so verflüssigt wurde.

Herkömmliche Objektträger wurden dazu durch Eintauchen in die dünnflüssige Agarose-Lösung an ihrer Oberseite mit einer dünnen Gelschicht beschichtet. Diese mussten über Nacht auf Zellstoff getrocknet werden und waren anschließend nahezu unbegrenzt haltbar. Es war daher nicht notwendig sie unmittelbar vor jedem Testdurchlauf frisch herzustellen. Die benötigte Menge konnte so in einer einmaligen „Massenproduktion“ gefertigt werden.

6.4 Probenaufbereitung für den Comet Assay-Test

Anders als bei der Zellpassage wurde für die Probenaufbereitung die Medium-Tetrapyrrol-Lösung aus den Vertiefungen der 6-Well-Platte nicht abgesaugt, sondern in Zentrifugenröhrchen überführt. Nachdem der Zellrasen, welcher in den Wells zurückblieb, mit 2 ml PBS gewaschen wurde, erfolgte die Ablösung mit 250 µl Akkutase sowie 1 ml Nährmedium pro Well. Die 3 unterschiedlich stark inkubierten Zellsuspensionen, sowie jene der Negativkontrolle wurden ihrer Konzentration entsprechend den vorab abgenommenen Medium-Tetrapyrrol-Lösungen zugeführt. Es folgten 3 Zentrifugations- (600 RPM; 7 min, 5 min, 5 min) und dazwischen 2 Waschschrirte mit je 1 ml PBS.

Anschließend an den letzten Zentrifugationsdurchgang wurden die Zellpellets in je 270 µl PBS gelöst und die Zellzahl für jedes Röhrchen bestimmt. Die Verdünnung der Suspensionen erfolgte gemäß der Berechnung des Verdünnungsfaktors für ca. 300 000 Zellen pro ml. Zur Kühlung wurden die Röhrchen auf Eis gestellt und unmittelbar auf die Objektträger für den Comet Assay-Test aufgetragen.

7. Comet Assay

Der Comet Assay – auch bekannt als “Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)” bzw. „Microgel Electrophoresis (MGE)” – beschreibt ein Testverfahren zur direkten Erfassung der DNA-Schädigung verschiedenster eukaryotischer Zellen. Etabliert wurde diese Methode von Östling und Johanson im Jahr 1984 zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen [Fairbairn *et al.* 1995]. Singh (1988) und Olive (1990) modifizierten den Comet Assay in den folgenden Jahren so weiter, dass auch die Erfassung von Einzelstrangbrüchen möglich wurde [Choucroun *et al.* 2001].

Auf Grund seiner sehr einfachen Methodik wird dieses Verfahren mittlerweile sehr oft für Genotoxizitätstests unterschiedlichster Substanzen verwendet [Choucroun *et al.* 2001]. Eine geringe Menge an Zellen wird dahingehend auf ein dünnes Agarosegel an einem Objektträger aufgebracht, einer Lyse sowie einer anschließenden Elektrophorese unterzogen und mit einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff gefärbt [Fairbairn *et al.* 1995]. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann folglich das Ausmaß an Zellschädigung hinsichtlich der Parameter „head-DNA“, „tail-DNA“, „tail-length“ und „tail moment“ beurteilt werden [Choucroun *et al.* 2001].

- **„head-DNA“:** Prozentueller Anteil der DNA, die im Zellkern („Kopf“) verblieben also nicht gewandert ist.
- **„tail-DNA“:** Prozentueller Anteil der DNA, die aus dem Zellkern gewandert ist und nun einen Schweif bildet.
- **„tail-Length“:** Länge des Kometenschweifs
- **„tail moment“ (TM):** Produkt aus “tail-length” x “tail-DNA”

Das Grundprinzip dieses Testverfahrens basiert auf der Wanderung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld. Diese resultieren aus einer Schädigung der DNA in

Form von Einzel- oder Doppelstrangbrüchen und sind in der Lage sowohl den Zellkern als auch die Zellwand zu durchdringen. Auf Grund ihrer negativen Ladung werden sie regelrecht aus dem Zellkern zum Pluspol hingezogen. Kleinere Bruchstücke wandern dabei weiter als große. Je größer also das Ausmaß der DNA-Schädigung und je kleiner die Bruchstücke desto ausgeprägter erscheint die DNA Wolke unter dem Fluoreszenzmikroskop [Choucroun *et al.* 2001].

Als „Comets“ werden typischerweise jene Zellen bezeichnet, die auf Grund eines hohen Ausmaßes an Schädigung eine regelrechte Wolke aus DNA Bruchstücken aufweisen. Sie gleichen somit dem Bild eines Kometenschweifes, der ihnen dahingehend ihren Namen gibt. Intakte Zellen bzw. Zellkerne erlauben keine Wanderung ihres Erbguts und erscheinen demnach auch nach der Elektrophorese in ihrer üblichen kugelförmigen Gestalt [Fairbairn *et al.* 1995].

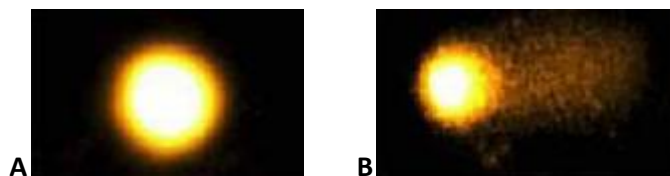


Abb. 14: Beurteilung des Grades einer DNA-Schädigung. Die Abbildungen A und B zeigen Bilder von gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop. Bei einer intakten Zelle (A) befindet sich die DNA im Zellkern und kann diesen nicht verlassen. Sie erscheint in ihrer üblichen Kugelform. Eine Zelle mit DNA-Schäden hingegen (B), zieht einen regelrechten Schweif an DNA-Bruchstücken hinterher und gleicht so dem Bild eines Kometen.

7.1 Aufbringen der Zellsuspension

Das Aufbringen der Zellsuspensionen auf die beschichteten Objektträger erfolgte auf einem gekühlten Tablett um die Zellen nicht zusätzlich zu schädigen und die Ergebnisse dadurch zu verfälschen. Diese Tatsache erforderte zügiges Arbeiten da das Aushärten der Zellgele auf diese Weise beschleunigt wurde.

Von der Mischung aus 140 µl flüssiger Low Melting Agarose und 30 µl Zellsuspension wurden 2 Spots zu je 70 µl auf einen Objektträger (Slide) aufgetragen und unmittelbar mit je einem Deckglas bedeckt. Die auf diese Weise gewonnenen dünnen, quadratischen Gele in Größe der Deckgläser sollten nach Möglichkeit eben sein und keine Luftblasen einschließen. Nach einer 10-minütigen Abkühl- und Härtingsphase im Kühlschrank wurden die Deckgläser entfernt und ein Teil der Proben einer Zellstressung unterzogen.

	Slides Probe	Slides für Zellstressung	
Probe 17 µM	2x	2x	
Probe 5 µM	2x	2x	
Probe 0,5 µM	2x	2x	
Neg.-Kontrolle	2x		2x
			Pos.-Kontrolle

Tab. 9: Probenschema für die Gelelektrophorese. Aus jeder der aufbereiteten Zellproben sowie der Negativkontrolle wurden 4 Objektträger mit je 2 Zellgelen gefertigt. Jeweils die Hälfte dieser Slides wurde einer Zellstressung unterzogen. Jene beiden der Negativkontrolle fungierten nach dieser Behandlung als entsprechende Positivkontrolle für die Auswertung.

7.2 Zellstressung

Als oxidativer Stress wird grundsätzlich eine Störung der Balance zwischen der Produktion freier Radikale und dem antioxidativen Abwehrsystem eines Organismus verstanden. Seine grundlegendste Eigenschaft ist es, Körperzellen aller Art und somit auch ihre DNA zu schädigen [Betteridge 2000]. Stressung von Zellen bedeutet also ihre Behandlung mit einem starken Oxidationsmittel. In unserem Fall handelte es sich um Tertiärbuthydroperoxid (t-BOOH) in einer Konzentration von 300 µM.

Diese Eigenschaft wurde in der vorliegenden Arbeit ausgenutzt, um einen möglichen antikanzerogenen Effekt humaner Tetrapyrrole auf die Krebszellen zu beurteilen. Die gestressten Zellen dienten dahingehend einerseits als möglicher Verstärkungsfaktor der getesteten Tetrapyrrole, andererseits als Positivkontrolle zu jenen Zellen die ausschließlich mit Tetrapyrrolen behandelt wurden. Beobachtete Effekte konnten so in Relation gesetzt und beurteilt werden.

Die Inkubation jener Slides, die für die Zellstressung vorgesehen waren erfolgte für 5 Minuten in einer Glaskammer, welche mit der Stresslösung befüllt war. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte eine Spülung mit destilliertem Wasser und die sofortige Überführung der Zellgele in die Lyselösung.

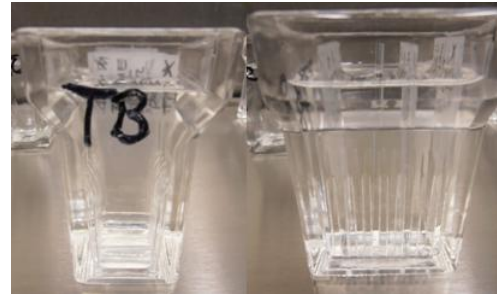


Abb. 15: Zellstressung. Durch Einschieben der Objektträger in die dafür vorgesehenen Abteilungen (Bild rechts) war die Erreichbarkeit der Stresslösung für alle Zellgele gleichermaßen gewährleistet.

7.3 Lyse

Eine Zelllyse beschreibt jenen aktiven Vorgang, der die Kern- und Zellmembranen entsprechend brüchig macht, sodass DNA-Fragmente, sofern vorhanden, austreten können. Im Zuge dessen werden auch Proteine und Lipide entfernt.

Die Lysebehandlung der HepG2-Zellen erfolgte für gestresste und nicht gestresste Zellen in zwei Glaskammern getrennt voneinander. Nach Fertigstellung der Lyselösung wurden die Zellgele darin genau 1 Stunde lang in kühler und dunkler Umgebung inkubiert.

7.4 Elektrophorese

Das Kernstück des Comet Assay-Tests stellt die anschließende Gelelektrophorese dar. Die notwendigen Apparaturen dafür wurden bereits gegen Ende des Ablaufs der Lysezeit im Kühlraum aufgebaut.

Nach Einschichten der Objektträger in die Elektrophoresekammer – frei gebliebene Plätze wurden mit leeren Slides aufgefüllt – erfolgte die Befüllung der Kammer mit der vorbereiteten Elektrophoreselösung. Luftblasen unterhalb der Objektträger wurden weitestgehend entfernt bevor die Kammer verschlossen und die Zellgele einer 20 minütigen Ruhephase („unwinding phase“) unterzogen wurden. Die DNA der Zellen wird in dieser Phase entspiralisiert und in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Alkalilabile Stellen werden dabei als Einzelstrangbrüchen sichtbar gemacht und bedingen so kleinere DNA-Fragmente, die in der Elektrophorese leichter wandern können.

Im Anschluss an diese Ruhephase wurde die Kammer an die Stromquelle angeschlossen und die benötigten Einstellungen wie folgt vorgenommen:

- Spannung: 25 V
- Stromstärke (mA): Maximum
- Leistung (W): Maximum
- Zeiteinheit: h
- Dauer: 30 min

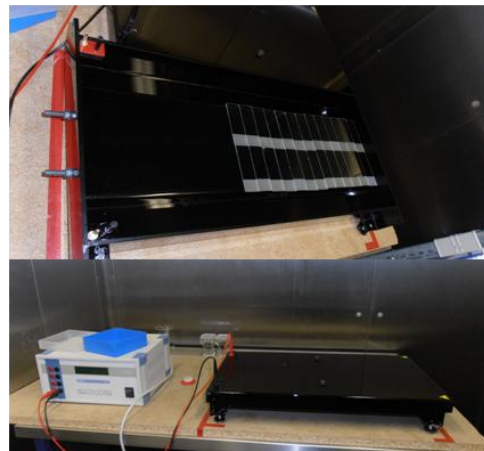


Abb. 16: Elektrophoresekammer. Die Objektträger müssen alle gleich in die Kammer eingeschichtet werden (Bild oben), der frei gebliebene Platz ist mit leeren Slides zu füllen. Das Bild unten zeigt den kompletten Aufbau der erforderlichen Apparaturen.

Die Stromstärke wurde auf 300 ± 10 mA durch Zugabe bzw. Entfernung von Elektrophoreselösung eingestellt. Die Elektrophorese dauerte 30 Minuten, der Vorgang wurde nach Ablauf dieser Zeit von der Stromquelle automatisch beendet. Vor Öffnung des Deckels und Entfernung der Objektträger aus der Kammer musste jedenfalls die Stromzufuhr unterbrochen werden.

7.5 Neutralisation

Als letzter Arbeitsschritt im Zuge des Comet Assay-Tests erfolgte die Neutralisation der Zellgele für je 5 Minuten in einem Neutralisationspuffer sowie destilliertem Wasser. Durch anschließendes Trocknen über Nacht wurden die Gele auf den Objektträgern fixiert und konnten so beliebig lange, in einer Box im Kühlschrank, aufbewahrt werden. Die Auswertung der Zellgele war von diesem Zeitpunkt an jederzeit möglich.

8. Weitere Tests

Im Zuge des Projekts „The Physiological Relevance of Bile Pigments“ wurden von einer weiteren Studiengruppe Flow-zytometrische Analysen mit Relevanz für diese Arbeit durchgeführt. Jene Untersuchungsergebnisse, die in die statistische Auswertung dieser Studie miteinbezogen wurde, sollen im Folgenden kurz erwähnt werden.

▪ **Apoptose/Nekrose Assay**

Die Apoptose- und Nekroseraten der HepG2-Zellen wurden mittels Annexin V-Markierung und anschließender Flow-zytometrischer Messung erfasst. Annexin besitzt hohe Affinität zu Phosphatidylserin, das bei intakten Zellen auf der Innenseite der Zellmembran lokalisiert. Auf diese Weise ist es für Annexin nicht zugänglich und liefert dahingehend ein negatives Testergebnis. In apoptotischen Zellen wird Phosphatidylserin an die Außenmembran transloziert, sodass Annexin daran binden und ein positives Testergebnis hervorbringen kann.

Die Zellnekrose wurde durch direkte Anbindung von 7-Aminoactinomycin-d (7-AAD) an Cytosin und Guanin Basen detektiert. Während dieser Farbstoff in nekrotische Zellen aufgrund ihrer perforierten Zellmembranen eintreten kann, nehmen intakte Zellen diesen nicht auf und liefern wiederum ein negatives Testergebnis.

▪ **Bestimmung intrazellulärer Superoxide und Hydroperoxide**

Zwei Reagenzien wurden für die Messung der intrazellulären vorhandenen Superoxide und Hydroperoxide herangezogen. Einerseits Dihydroethidium (DHE), das Zellmembranen durchdringen kann und intrazellulär mit O_2^- reagiert. Das resultierende Oxyethidium ist in der Lage mit Nukleinsäuren zu interagieren, was seine rote Fluoreszenz, die zytometrisch erfasst werden kann, zur Folge hat.

Andererseits wurde Dihydrofluorescein Diazetat (DCFH-DA) verwendet, welches ebenso die Fähigkeit besitzt ins Zellinnere zu gelangen um dort von Peroxiden zu fluoreszierendem 7'-Dichlorodihydrofluorescein zu werden.

- **Zellzyklus Assay:**

Dieses Testverfahren erlaubt sowohl Aussagen über die Menge an Zellen die sich in einer bestimmten Phase des Zellzyklus (G0/1, S, G2, M) bzw. in Zellzyklusarrest befinden als auch jene die sich in einer Apoptosephase befinden. In Abhängigkeit von der Anzahl an DNA-Kopien im Zellkern, werden unterschiedliche Intensitäten fluoreszierender Komponenten erfasst und können so entsprechenden Zyklusphasen zugeordnet werden. Die dazu nötige Färbung und Detektion erfolgte mittels Propidiumiodid (PI).

9. Auswertung

Die Auswertung der Zellgele erfolgte durch Färbung mit toxischem Ethidiumbromid-Fluoreszenzfarbstoff sowie anschließender fluoreszenzmikroskopischer Messung der durchschnittlichen prozentuellen DNA-Schädigung („damage“) der Zellen pro Gel. Diese erfolgte computerunterstützt anhand der Software Comet 5.5.

Das Fluoreszenzmikroskop, welches an ein Computersystem gekoppelt ist sowie alle benötigten Laborutensilien befanden sich an einem vom restlichen Labor abgetrennten Arbeitsplatz, der deutlich als „Toxic-Bereich“ gekennzeichnet war. Dieser durfte aus Sicherheitsgründen nur mit einem dafür vorgesehenen Labormantel und Handschuhen betreten und in Betrieb genommen werden. Vor Verlassen dieses Bereiches musste die Schutzkleidung abgelegt werden.

9.1 Färben der Zellgele

Ethidiumbromid ist eine toxische Substanz, die mit der DNA interkaliert und auf diese Weise sowohl intaktes Material als auch Bruchstücke markiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop können auf diese Weise DNA-Schädigungen ebenso wie Zellkern-DNA sichtbar gemacht werden.

Das Färben der Zellgele erfolgte unmittelbar vor dem Auszählen der Gele mit 30 µl Ethidiumbromid-Farbreagenz (20 µg/ml) pro Zellgel. Vor dem Einlegen der Objektträger wurden die Gele mit einem Deckglas bedeckt.

9.2 Auszählen der Zellgele

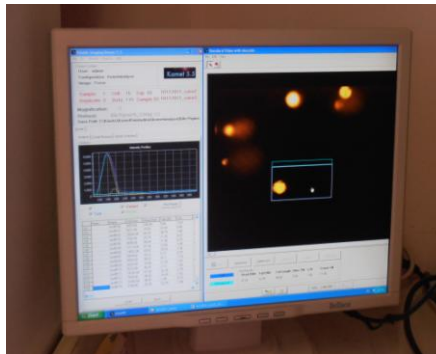


Abb. 17: Elektronische Datenauswertung. Die Abbildung zeigt die Bildschirmmaske der Comet 5.5-Software. Die rechte Seite des Bildschirms mit den orangenen Punkten zeigt die eingestellte Aufnahme der Zellen im Mikroskop. Linksseitig können diverse Berechnungen sowie die „tail-DNA“-Werte der ausgewählten Zellen abgelesen werden.

Das sogenannte Auszählen der Zellgele erfolgte mit einer speziell dafür entwickelten Computersoftware, „Comet 5.5“. Die Kopplung des Mikroskops mit dem Computersystem ermöglichte die Projektion der Mikroskopeinstellungen auf den Computerbildschirm, wo Zellen per Mausklick ausgewählt und direkt von der Software hinsichtlich ihrer „tail-DNA“-Werte untersucht wurden.

Pro Zellgel wurden 50 Zellen zufällig ausgewählt und vermessen. Es wurde dabei nach folgendem, eigens entwickelten, Zählschema (Abb. 18) vorgegangen:

Der Beginn erfolgte im linken oberen Eck des Gels, wobei an seinem Rand auf jeder Seite ca. 1 mm ausgespart wurde. In einem imaginären Schlangenliniensystem wurden in 10 Reihen je 5 Zellen gezählt. Das entsprach – je nach Zelldichte – etwa jeder 25. - 30. Zelle. Von jeder Probe wurden so insgesamt 6 Gele ausgezählt, wobei je drei von gestressten und nicht gestressten Zellen stammten. Von der Negativ- und Positivkontrolle wurden ebenso je 3 Gele ausgezählt. Für jede Probe verblieb so ein Ersatzgel, das gegebenenfalls zur Auswertung herangezogen werden konnte.

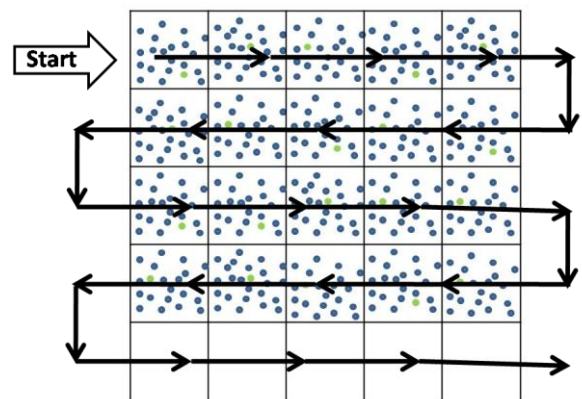


Abb. 18: Zählschema für die Auswertung der Zellgele. Entsprechend dem dargestellten Schlangenliniensystem wurden die Zellgele ausgezählt. Pro Reihe wurden 5 Zellen gewertet (grüne Punkte). Insgesamt wurden imaginär 10 Reihen gebildet.

Tabelle 10 zeigt einen schematischen Überblick über die Gesamtheit der ausgewerteten Proben. Da die Versuchsreihe in Doppelbestimmung durchgeführt wurde, sind die Gesamtzahlen in doppelter Menge zu verstehen.

	Bilirubin	Bilirubin Ditaurat	Bilirubin Dimethylester	Protoporphyrin
17 μ M (nur Lyse)	3 Gele	3 Gele	3 Gele	3 Gele
5 μ M (nur Lyse)	3 Gele	3 Gele	3 Gele	3 Gele
0,5 μ M (nur Lyse)	3 Gele	3 Gele	3 Gele	3 Gele
Negativ Kontrolle	3 Gele	3 Gele	3 Gele	3 Gele
17 μ M (+ <i>t</i> -BOOH)	3 Gele	3 Gele	3 Gele	3 Gele
5 μ M (+ <i>t</i> -BOOH)	3 Gele	3 Gele	3 Gele	3 Gele
0,5 μ M (+ <i>t</i> -BOOH)	3 Gele	3 Gele	3 Gele	3 Gele
Positiv Kontrolle	3 Gele	3 Gele	3 Gele	3 Gele
Gesamt	24 Gele	24 Gele	24 Gele	24 Gele
96 Zellgele				

Tab. 10: Schematische Darstellung der Probenauswertung des Comet Assay-Tests. Die Anzahl der ausgezählten Zellgele pro Tetrapyrrol aufgeteilt auf Zellproben mit Stressung und ohne beträgt insgesamt 96. Die Berücksichtigung der Durchführung in Doppelbestimmung ergibt eine Gesamtzahl von 192 Gelen.

9.3 Datenauswertung

Beim Datenoutput aus der Comet 5.5-Software handelte es sich um ein Datenset aus genau 50 Prozentwerten für die „tail-DNA“ jedes Zellgels. Durch den Export dieser Daten in eine MS Excel-Datei konnte aus diesen Einzelwerten der Mittelwert der prozentuellen DNA-Schädigung („tail-DNA“) für jedes Gel berechnet werden. Jene 3 Mittel-

werte die so für jede Probe ermittelt wurden, wurden im Anschluss in die Statistiksoftware SPSS 17.0 eingegeben und einer statistischen Auswertung unterzogen.

9.4 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung der Daten aus dem Comet Assay wurde mittels SPSS 17.0 durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $P \leq 0,05$ angenommen. Nach Berechnung *deskriptiver Parameter* innerhalb der Gruppen (nur Lyse bzw. mit *t*-BOOH) für jedes der 4 Tetrapyrrole war auf Grund der teilweise relativ hohen Standardabweichung die Durchführung einer Ausreißerbereinigung erforderlich.

Es folgte die Überprüfung einer Normalverteilung der Daten innerhalb der genannten Gruppen mittels *Kolmogorov-Smirnoff-Test*. Hinsichtlich der Strenge dieses Tests wurde zusätzlich eine grafische Darstellung der Daten in Form von Histogrammen erstellt.

Die Tatsache, dass die Daten nicht in jeder Gruppe Normalverteilung aufwiesen machte die Durchführung eines Mittelwertvergleichs mit ANOVA (T-Test) nicht möglich. Daher wurde zum Vergleich der Probenmittelwerte eine einfaktorielle ANOVA mit Post-Hoc-Test (Tamhane) berechnet.

Des Weiteren wurden bivariate Korrelationen mit Sekundärdaten aus einem Apoptose/Nekrose Assay, Zellzyklus Assay und einem Test zur Erfassung der intrazellulären Superoxide und Hydroperoxide durchgeführt.

IV. ERGEBNISSE

1. Bilirubin

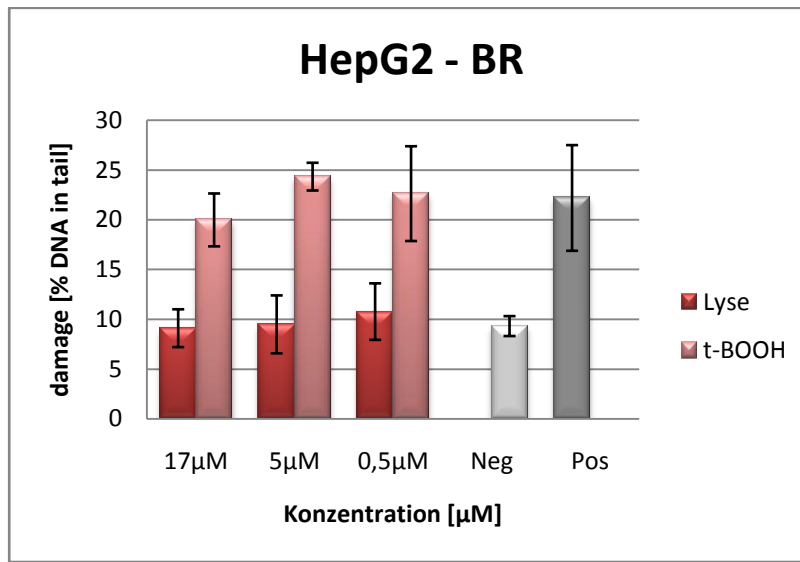


Abb. 19: Mittlere prozentuelle DNA-Schädigung durch das Tetrapyrrol Bilirubin. Die Grafik zeigt die Mittelwerte der prozentuellen DNA-Schädigung (damage [% DNA in tail]) in HepG2-Zellen die durch Inkubation mit dem Tetrapyrrol Bilirubin in den Konzentrationen 17 µM, 5 µM und 0,5 µM hervorgerufen wurden. Es werden sowohl die Werte für Positiv- und Negativkontrolle (dunkel- bzw. hellgrau), als auch jene für gestresste (hellrot) und ungestresste Zellen (dunkelrot) abgebildet.

BR Lyse	17 µM	5 µM	0,5 µM	Neg	Pos
Neg	1	1	0,907		0,006
Pos	0,004	0,003	0,007	0,006	

BR t-BOOH	17 µM	5 µM	0,5 µM	Neg	Pos
Neg	0	0	0,002		0,006
Pos	0,987	0,985	1	0,006	

Tab. 11: Signifikanz der Mittelwerte für Bilirubin-induzierte DNA-Schädigung. Die Tabelle listet jene Signifikanzwerte, die im Mittelwertvergleich mittels einfaktorieller ANOVA für die DNA-Schädigung der gestressten sowie der nicht gestressten Zellen durch Bilirubin, ermittelt wurden. Rot gedruckt sind jene Werte, die auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant sind.

Das Ausmaß an DNA-Schädigung der HepG2-Zellen in der Positivkontrolle unterscheidet sich von der Negativkontrolle wie erwartet durch etwa 14 %. Dies entspricht in etwa jener Differenz, die in der Vortestphase erprobt wurde. Der statistische Test zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen dieser beiden Werte (Tab. 11).

Bilirubin per se zeigt weder bei ungestressten noch bei gestressten Zellen ein erhöhtes Ausmaß an DNA-Schädigung. Diese liegen sowohl bei *t*-BOOH-behandelten Zellen als auch bei jenen, die nur einer Lyse unterzogen wurden, auf demselben Schädigungslevel wie entsprechend die Positiv- bzw. Negativkontrolle.

Lediglich die Behandlung gestresster Zellen mit Bilirubin in einer Konzentration von 5 μ M zeigt eine leichte Tendenz einer erhöhten Schädigungsrate von etwa 2 Prozentpunkten, die jedoch im Test nicht signifikant ist (Tab. 11). Ebenso nicht signifikant aber auffallend, ist die Tendenz der 17 μ M Konzentration, einer geringfügigeren Schädigung als die Positivkontrolle. Das könnte im Falle eines signifikanten Unterschieds auf das antioxidative Potenzial des Bilirubins im Zusammenhang mit HepG2-Zellen hindeuten.

	Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]
Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]	1
Intrazelluläre Superoxide [%]	0,523

Abb. 20: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin in ungestressten Zellen und dem Vorhandensein intrazellulärer Superoxide. Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen mittleren Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Bilirubin und dem prozentuellen Anteil an intrazellulär vorhandenen Superoxiden. Die Korrelation ist nicht signifikant ($p=0,055$).

	Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]
Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]	1
Intrazelluläre Hydroperoxide [%]	0,932**

Abb. 21: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin in ungestressten Zellen und dem Vorhandensein intrazellulärer Hydroperoxide. Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen starken Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Bilirubin und dem prozentuellen Anteil an intrazellulär vorhandenen Hydroperoxiden. ** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

	Damage (t-BOOH) [% DNA in tail]
Damage (t-BOOH) [% DNA in tail]	1
Intrazelluläre Hydroperoxide [%]	0,602*

Abb. 22: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin in gestressten Zellen und dem Vorhandensein intrazellulärer Hydroperoxide. Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen mittleren Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Bilirubin in Verbindung mit t-BOOH-Stressung und dem prozentuellen Anteil an intrazellulär vorhandenen Hydroperoxiden. * Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Die Korrelationstests zeigen positive Zusammenhänge zwischen dem Grad der DNA-Schädigung nach Bilirubinbehandlung und der prozentuellen Menge an intrazellulär vorhandenen Hydroperoxiden. Superoxide korrelieren nur in ungestressten Zellen und zeigen lediglich einen schwachen, mittleren Zusammenhang, der im statistischen Test, zwar nur knapp aber dennoch, keine Signifikanz aufweist ($p = 0,055$).

Hydroperoxide hingegen zeigen bei nicht gestressten Hep-G2-Zellen einen sehr starken, hochsignifikanten und bei gestressten immerhin einen mittleren Zusammenhang, der auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant ist.

	Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]
Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]	1
Zellen in G0/1 Phase (Zellzyklus Arrest) [%]	0,714**

Abb. 23: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin in ungestressten Zellen dem Zellzyklus (G0/1-Phase). Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen starken Zusammenhang zwischen der DNA Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Bilirubin und der prozentuellen Menge an Zellen in G0/1 Phase des Zellzyklus (Zellzyklus Arrest). ** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

	Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]
Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]	1
Zellen in S Phase (Synthese) [%]	- 0,508

Abb. 24: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (S-Phase). Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen mittleren Zusammenhang zwischen der DNA Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Bilirubin und der prozentuellen Menge an Zellen in der S-Phase des Zellzyklus (Zellzyklus Arrest). Die Korrelation ist nicht signifikant ($p=0,064$).

Ebenso konnte ein Zusammenhang zwischen Bilirubin-induzierter DNA-Schädigung und dem prozentuellen Anteil an Zellen in der G0/1- Phase bzw. S-Phase des Zellzyklus in Bezug auf Zellzyklus Arrest gefunden werden.

Jener Anteil an Zellen, in der G0/1-Phase zeigt eine starke hochsignifikante positive Korrelation mit dem Ausmaß an Schädigungen der DNA im Comet Assay Test. Die prozentuelle Menge an Zellen in der S-Phase des Zellzyklus hingegen weist einen mittleren, negativen Zusammenhang auf. Je höher das zu beobachtende Ausmaß an DNA-Schädigungen der Zellen, desto geringer dürfte der Anteil jener Zellen sein, die die S-Phase des Zellzyklus überhaupt erreichen. Dieser Zusammenhang zeigt jedoch keine statistische Signifikanz.

2. Bilirubin Ditaurat

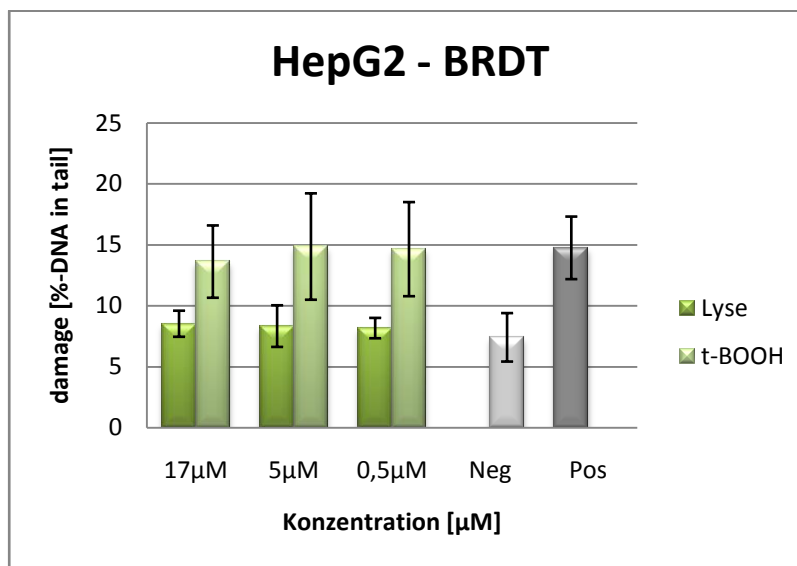


Abb. 25: Mittlere prozentuelle DNA-Schädigung durch das Tetrapyrrol Bilirubin Ditaurat. Die Grafik zeigt die Mittelwerte der prozentuellen DNA-Schädigung (damage [% DNA in tail]) in HepG2-Zellen die durch Inkubation mit dem Tetrapyrrol Bilirubin Ditaurat in den Konzentrationen 17 µM, 5 µM und 0,5 µM hervorgerufen wurden. Es werden sowohl die Werte für Positiv- und Negativkontrolle (dunkel- bzw. hellgrau), als auch jene für gestresste (hellgrün) und ungestresste Zellen (dunkelgrün) abgebildet.

BRDT Lyse	17 µM	5 µM	0,5 µM	Neg	Pos
Neg	0,927	0,99	0,992		0,001
Pos	0,003	0,002	0,003	0,001	

BRDT t-BOOH	17 µM	5 µM	0,5 µM	Neg	Pos
Neg	0,009	0,03	0,017		0,001
Pos	0,998	1	1	0,001	

Tab. 12: Signifikanz der Mittelwerte für Bilirubin Ditaurat-induzierte DNA-Schädigung. Die Tabelle listet jene Signifikanzwerte, die im Mittelwertvergleich mittels einfaktorieller ANOVA für die DNA-Schädigung der gestressten sowie der nicht gestressten Zellen durch Bilirubin Ditaurat, ermittelt wurden. Grün gedruckt sind jene Werte, die auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant sind.

Auch Bilirubin Ditaurat zeigt sowohl in der graphischen Darstellung der mittleren DNA-Schädigung in Hep G2-Zellen wie auch im statistischen Mittelwertvergleich keine signi-

fikanten Unterschiede. Diese Datenlage lässt demnach auf keine DNA-schädigende Wirkung des Bilirubin Ditaurs selbst schließen. Diesbezüglich zeigt auch in diesem Fall nur die Zellstressung mit Tertiärbutylhydroperoxid einen deutlichen Effekt, wie man wiederum am Vergleich der Positiv- und Negativkontrolle beobachten kann.

Einen starken Zusammenhang weist die DNA-Schädigung der Zellen mit der Apoptose-rate auf (Abb. 26). Die hochsignifikante Korrelation könnte einen Hinweis auf erhöhte Apoptoseneigung der Zellen durch Behandlung mit Bilirubin Ditaurat geben.

	Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]
Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]	1
Zellen in Apoptose [%]	0,737**

Abb. 26: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin Ditaurat in ungestressten Zellen und dem Ausmaß an Apoptose. Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen starken Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Bilirubin Ditaurat und der prozentuellen Menge an Zellen, die sich in Apoptose befinden. ** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

	Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]
Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]	1
Zellen in S Phase (Synthese) [%]	- 0,682*

Abb. 27: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin Ditaurat in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (S-Phase). Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen mittleren, jedoch nicht signifikanten Zusammenhang zwischen der DNA Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Bilirubin Ditaurat und der prozentuellen Menge an Zellen in der S-Phase des Zellzyklus (Zellzyklus Arrest). * Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

	Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]
Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]	1
Zellen in G2/M Phase (Mitose) [%]	- 0,623*

Abb. 28: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin Ditaurat in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (G2/M-Phase). Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen mittleren zwischen der DNA Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Bilirubin Ditaurat und der prozentuellen Menge an Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus (Zellzyklus Arrest). * Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

HepG2-Zellen die mit Bilirubin Ditaurat, nicht jedoch dem Stressfaktor *t*-BOOH behandelt wurden, korrelieren negativ mit prozentuellen Datenwerten aus dem Zellzyklus Assay. Im Sinne eines Zellzyklus Arrests weisen diese einen umgekehrten Zusammenhang mit dem Anteil an Zellen in der S-Phase bzw. der G2/M-Phase auf. Beide Korrelationen erreichen mittlere bis hohe Aussagekraft und zeigen im statistischen Test signifikante Zusammenhänge.

3. Bilirubin Dimethylester

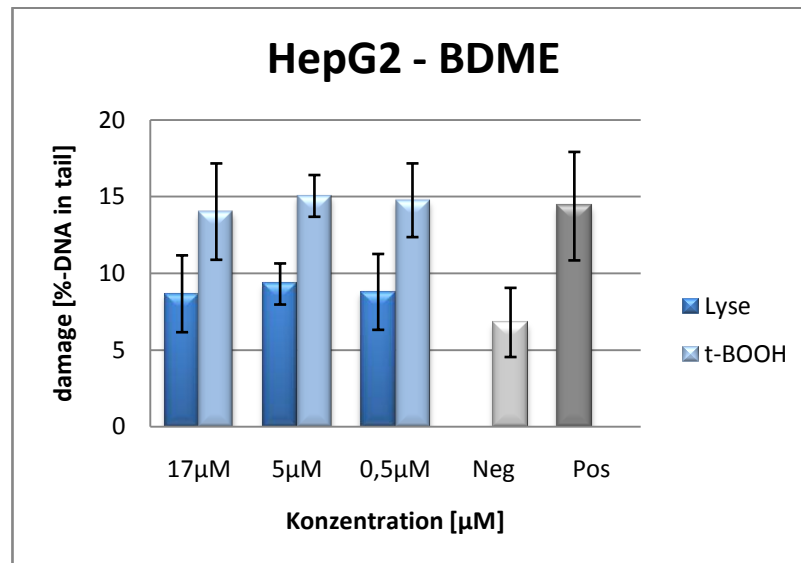


Abb. 29: Mittlere prozentuelle DNA-Schädigung durch das Tetrapyrrol Bilirubin Dimethylester. Die Grafik zeigt die Mittelwerte der prozentuellen DNA-Schädigung (damage [% DNA in tail]) in HepG2-Zellen die durch Inkubation mit dem Tetrapyrrol Bilirubin Dimethylester in den Konzentrationen 17 µM, 5 µM und 0,5 µM hervorgerufen wurden. Es werden sowohl die Werte für Positiv- und Negativkontrolle (dunkel- bzw. hellgrau), als auch jene für gestresste (hellblau) und ungestresste Zellen (dunkelblau) abgebildet.

BDME Lyse	17 µM	5 µM	0,5 µM	Neg	Pos
Neg	0,862	0,183	0,704		0,003
Pos	0,04	0,042	0,03	0,003	

BDME t-BOOH	17 µM	5 µM	0,5 µM	Neg	Pos
Neg	0,002	0	0,001		0,003
Pos	1	1	1	0,003	

Tab. 13: Signifikanz der Mittelwerte für Bilirubin Dimethylester-induzierte DNA-Schädigung. Die Tabelle listet jene Signifikanzwerte, die im Mittelwertvergleich mittels einfaktorieller ANOVA für die DNA-Schädigung der gestressten sowie der nicht gestressten Zellen durch Bilirubin Dimethylester, ermittelt wurden. Blau gedruckt sind jene Werte, die auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant sind.

Bilirubin Dimethylester zeigt wie bereits Bilirubin und Bilirubin Ditaurat keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Mittelwerte der behandelten gestressten und nicht

gestressten HepG2-Zellen. Eine Tendenz, insbesondere der nicht gestressten Zellen, in Richtung einer geringfügig erhöhten DNA-Schädigung im Vergleich zu Negativ- sowie Positivkontrolle kann anhand der grafischen Darstellung der Mittelwerte beobachtet werden (Abb. 29).

HepG2-Zellen, die mit Bilirubin Dimethylester, nicht jedoch mit Tertiärbutylhydroperoxid behandelt wurden stehen statistisch signifikant in mittlerem Zusammenhang mit der Apoptoserate der Zellen (Abb. 30).

	Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]
Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]	1
Zellen in Apoptose [%]	0,590*

Abb. 30: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin Dimethylester in ungestressten Zellen und dem Ausmaß an Apoptose. Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen starken Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Bilirubin Dimethylester und der prozentuellen Menge an Zellen, die sich in Apoptose befinden. * Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

	Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]
Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]	1
Zellen in G0/1 Phase (Zellzyklus Arrest) [%]	- 0,482

Abb. 31: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin Dimethylester in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (G0/1-Phase). Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen mittleren Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Bilirubin Dimethylester und der prozentuellen Menge an Zellen in G0/1-Phase des Zellzyklus (Zellzyklus Arrest). Die Korrelation ist nicht signifikant ($p=0,069$).

	Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]
Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]	1
Zellen in S Phase (Synthese) [%]	- 0,677**

Abb. 32: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin Dimethylester in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (S-Phase). Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen mittleren Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Bilirubin Dimethylester und der prozentuellen Menge an Zellen in S-Phase des Zellzyklus (Zellzyklus Arrest). ** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Auch HepG2-Zellen, welche mit Bilirubin Dimethylester behandelt und ausschließlich einer Lyse unterzogen wurden, zeigen Zusammenhänge mit einem Zellzyklus Arrest auf. Es handelt sich wiederum um negative Zusammenhänge die von mittlerer Stärke (G0/1-Phase) ohne statistische Signifikanz bis hin zu einem starken, statistisch signifikanten Zusammenhang (S-Phase) reichen.

4. Protoporphyrin

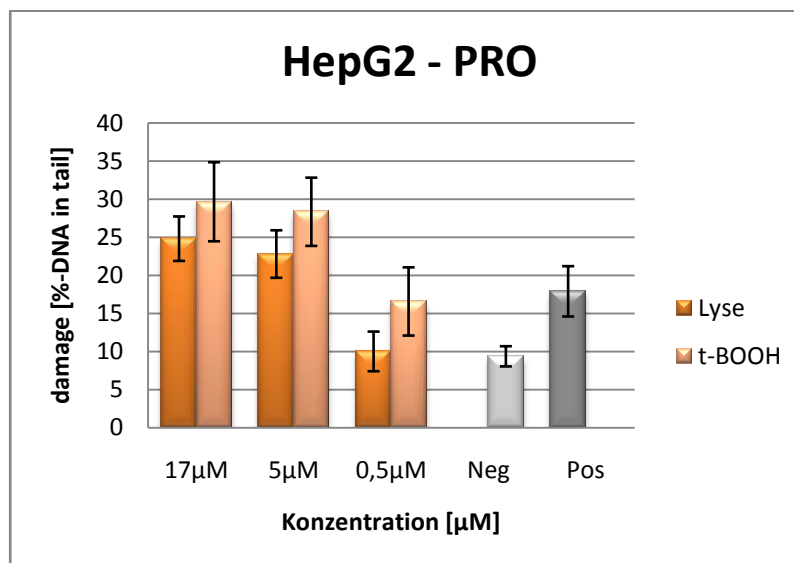


Abb. 33: Mittlere prozentuelle DNA-Schädigung durch das Tetrapyrrol Protoporphyrin. Die Grafik zeigt die Mittelwerte der prozentuellen DNA-Schädigung (damage [% DNA in tail]) in HepG2-Zellen die durch Inkubation mit dem Tetrapyrrol Protoporphyrin in den Konzentrationen 17 µM, 5 µM und 0,5 µM hervorgerufen wurden. Es werden sowohl die Werte für Positiv- und Negativkontrolle (dunkel- bzw. hellgrau), als auch jene für gestresste (hellorange) und ungestresste Zellen (dunkelorange) abgebildet.

PRO Lyse	17 µM	5 µM	0,5 µM	Neg	Pos
Neg	0	0	1		0,001
Pos	0,006	0,084	0,001	0,001	

PRO t-BOOH	17 µM	5 µM	0,5 µM	Neg	Pos
Neg	0	0	0,022		0,001
Pos	0,002	0,001	0,999	0,001	

Tab. 14: Signifikanz der Mittelwerte für Protoporphyrin-induzierte DNA-Schädigung. Die Tabelle listet jene Signifikanzwerte, die im Mittelwertvergleich mittels einfaktorieller ANOVA für die DNA-Schädigung der gestressten sowie der nicht gestressten Zellen durch Protoporphyrin, ermittelt wurden. Orange gedruckt sind jeweils jene Werte, die auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant sind.

Von allen untersuchten Tetrapyrrolen zeigt Protoporphyrin die prägnantesten Ergebnisse. Sowohl die gestressten Zellen als auch jene die nur lysiert wurden, zeigen ein deutlich größer werdendes Ausmaß an DNA-Schädigung mit steigender Konzentration

des Protoporphyrins. Mit Ausnahme der 0,5 μM Konzentration weisen alle Mittelwerte im statistischen Vergleich signifikante Unterschiede auf.

Besonders deutlich unterstreicht diese DNA-schädigende Wirkung des Protoporphyrins die Tatsache, dass bereits der prozentuelle „damage“-Wert der Konzentration 0,5 μM jenen der Negativkontrolle geringfügig übersteigt. Die Konzentrationen 5 μM und 17 μM der ungestressten Zellen weisen sogar statistisch signifikante Werte auf, die etwa 10 % über jenem der Positivkontrolle liegen.

	Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]
Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]	1
Zellen in Nekrose [%]	- 0,485

Abb. 34: Korrelation der DNA-Schädigung durch Protoporphyrin in ungestressten Zellen und dem Ausmaß an Nekrose. Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen mittleren Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Protoporphyrin und der prozentuellen Menge an Zellen, die sich in Nekrose befinden. Die Korrelation ist nicht signifikant ($p = 0,110$).

	Damage (t-BOOH) [% DNA in tail]
Damage (t-BOOH) [% DNA in tail]	1
Zellen in Nekrose [%]	- 0,654*

Abb. 35: Korrelation der DNA-Schädigung durch Protoporphyrin in gestressten Zellen und dem Ausmaß an Nekrose. Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen mittleren Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Protoporphyrin und der prozentuellen Menge an Zellen, die sich in Apoptose befinden.

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Des Weiteren weisen HepG2-Zellen nach Protoporphyrin-Behandlung negative Korrelationen mit Daten aus dem Nekrose Assay auf. Sowohl gestresste als auch nicht gestresste Zellen zeigen einen mittleren Zusammenhang, wobei jener der gestressten etwas stärker und statistisch signifikant im Gegensatz zu dem der ungestressten ist.

	Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]
Damage (nur Lyse) [% DNA in tail]	1
Intrazelluläre Superoxide [%]	0,631*

Abb. 36: Korrelation der DNA-Schädigung durch Protoporphyrin in ungestressten Zellen und dem Vorhandensein intrazellulärer Superoxide. Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen mittleren, jedoch nicht signifikanten, Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Protoporphyrin und dem prozentuellen Anteil an intrazellulär vorhandenen Superoxiden. * Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

	Damage (t-BOOH) [% DNA in tail]
Damage (t-BOOH) [% DNA in tail]	1
Intrazelluläre Superoxide [%]	0,663**

Abb. 37: Korrelation der DNA-Schädigung durch Protoporphyrin in gestressten Zellen und dem Vorhandensein intrazellulärer Superoxide. Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen mittleren, jedoch nicht signifikanten, Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Protoporphyrin und dem prozentuellen Anteil an intrazellulär vorhandenen Superoxiden. ** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Auch der prozentuelle Anteil intrazellulär vorhandener Superoxide zeigt einen Zusammenhang mit der DNA-schädigenden Wirkung des Protoporphyrins in HepG2-Zellen. Die Stärke der Korrelation entspricht für gestresste und nicht gestresste Zellen gleichermaßen einer mittelmäßigen. Beide zeigen dahingehend statistische Signifikanz.

	Damage (t-BOOH) [% DNA in tail]
Damage (t-BOOH) [% DNA in tail]	1
Zellen in G0/1 Phase (Zellzyklus Arrest) [%]	- 0,531*

Abb. 38: Korrelation der DNA-Schädigung durch Protoporphyrin in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (G0/1-Phase). Der Korrelationstest in SPSS zeigt einen starken Zusammenhang zwischen der DNA Schädigung der HepG2-Zellen durch das Tetrapyrrol Protoporphyrin und der prozentuellen Menge an Zellen in G0/1 Phase des Zellzyklus (Zellzyklus Arrest). *Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Wie bereits an allen weiteren Vertretern der getesteten Tetrapyrrole angesprochen, kann auch im Fall der Protoporphyrin-inkubierten Proben von einer mittelmäßigen, negativen Korrelation mit dem Zellzyklus Arrest gesprochen werden. Statistisch signifikant befinden sich weniger Zellen in der G0/1-Phase des Zellzyklus, je größer das Ausmaß der DNA-Schädigung im Comet Assay Test ist.

V. DISKUSSION

Die letzten Jahre brachten einige wenige Studien hervor, die sich mit dem antikanzerogenen Potenzial humaner Gallenpigmente und ihrer Derivate beschäftigen. Diese behandelten jedoch bevorzugt die Untersuchung der Tetrapyrrole Bilirubin und Protoporphyrin. Einer eingehenden Literaturrecherche zufolge, ist die vorliegende Arbeit die erste, die sich gezielt auch um die Untersuchung von Bilirubin Dimethylester und Bilirubin Ditaurat bemüht hat. Des Weiteren wurde die Methode, Tetrapyrrol-induzierte DNA-Schädigungen mittels Comet Assay-Test zu erfassen, mit Ausnahme der vorliegenden Arbeit bisher nur von einer einzigen weiteren Arbeitsgruppe [Rao *et al.* 2006] angewandt.

Zum überwiegenden Teil wurde bisher der Zusammenhang erhöhter Bilirubinspiegel im Blut mit der Risikoprävalenz bestimmter Krebserkrankungen *in vivo* untersucht [Wei *et al.* 2000; Ko *et al.* 1994; Zucker *et al.* 2004; Horsfall *et al.* 2011; Temme *et al.* 2001; Jirásková *et al.* 2011]. Diese Studien geben bestenfalls Hinweise auf ein mögliches antikanzerogenes Potenzial humaner Gallenpigmente und ihrer Derivate.

Auch die vorliegende *in vitro* Studie konnte mit Ausnahme des Protoporphyrins keine Evidenz für ein antikanzerogenes Potenzial humaner Tetrapyrrole erbringen. Im Gegenteil, konnten im Zusammenhang mit Bilirubin, Bilirubin Dimethylester sowie Bilirubin Ditaurat lediglich schwache Tendenzen in Richtung eines zellschädigenden Effekts der HepG2 Zellen aufgezeigt werden.

Interessanterweise deckt sich das vorliegende Ergebnis in Hinblick auf das Gallenpigment Bilirubin mit jenen von Rao und Kollegen, die in ihrer Arbeit ebenso das antikanzerogene Potenzial auf HepG2 Zellen sowie TMK-1 Zellen untersuchten. Die Tatsache dass Bilirubin in TMK-Zellen prooxidative und somit eine antikanzerogene Wirkung entfaltete, in HepG2-Zellen hingegen antioxidative, also zellschützende veranlasste sie

zu der Vermutung dass die Wirkungsweise des Bilirubins von der vorhandenen Zelllinie abhängen muss [Rao *et al.* 2006]. Die Resultate der vorliegenden Studie unterstützen ihre Mutmaßung, insbesondere in Hinblick auf einen antioxidativen Effekt im Zusammenhang mit pathologischen Krebszellen. Betrachtet man die DNA-Schädigung der 17 $\mu\text{molaren}$ Konzentration des Bilirubins, so lässt sich eine dezente Neigung in Richtung eines geringeren Schädigungsausmaßes als jenes der Negativkontrolle erkennen. Bilirubin dürfte seine antioxidativen Fähigkeiten also tatsächlich sowohl in Zusammenhang mit physiologischen Körperzellen als auch mit pathologisch entarteten Zellen entfalten.

An Kolonkrebszellen dürfte Bilirubin wiederum antikanzerogene Effekte aufweisen, wie eine *in vitro* Arbeit von Keshavan und Kollegen beobachten konnte [Keshavan *et al.* 2004].

Das Ausbleiben einer antikanzerogenen Wirkung der Tetrapyrrole Bilirubin, Bilirubin Ditaurat und Bilirubin Dimethylester legt nahe, dass die Inkubationskonzentrationen möglicherweise zu gering gewählt wurden. Gerade Bilirubin wird in letzter Zeit im Sinne seiner antioxidativen und zellprotektiven Kapazität in der Literatur vermehrt bei Patienten mit Vorliegen einer genetisch bedingten, moderaten Hyperbilirubinämie diskutiert [Hunt *et al.* 2001; Vitek *et al.* 2002]. In Anbetracht der Tatsache, dass diese Menschen Blubilirubinspiegel bis zu 84 $\mu\text{mol/l}$ [Kamisako *et al.* 2000], im Mittel aber etwa 18 – 50 $\mu\text{mol/l}$ aufweisen [Burchell und Hume 1999], könnten möglicherweise Konzentrationen zwischen 20 und 50 $\mu\text{mol/l}$ die erwarteten Effekte zeigen.

Im Fall des Bilirubin Ditaurats könnte der Hintergrund seiner nicht eingetretenen antikanzerogenen Wirkung in der Wasserlöslichkeit des Tetrapyrrols liegen. Während Bilirubin aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften problemlos die Doppellipidmembranen diverser Zellen passieren kann, bedarf seine konjugierte Form einer aktiven Transportmöglichkeit durch die Membran [Löffler *et al.* 2006]. Eine *in vitro* Studie bezüglich

des antimutagenen Potenzials humaner Gallenpigmente konnten diesen Effekt gleichermaßen beobachten [Bulmer *et al.* 2007].

Zucker und Kollegen stellten zwar fest, dass auch Bilirubin Ditaurat bis zu einem gewissen Grad in der Lage ist, durch Zellmembranen zu diffundieren, jedoch dürfte dieser Vorgang so langsam von statten gehen, dass das Ausmaß äußerst gering ist [Zucker *et al.* 1999].

Da es sich beim Bilirubin Dimethylester um ein Konjugatderivat des Bilirubin Ditaurats handelt, könnte eine Erklärung für das Fehlen eines beobachtbaren antikanzerogenen Effekts anhand des Problems der Membrandurchlässigkeit durchaus auch in diesem Fall zutreffen.

Die Zusammenhänge dieser beiden Tetrapyrrole mit der Apoptoserate der HepG2-Zellen im Apoptose/Nekrose Assay geben dennoch Hinweise auf das Vorhandensein einer DNA-schädigenden Wirkung.

Zudem weiß man, dass DNA-schädigende Substanzen in der Lage sind Zellzyklus Arrest und dadurch hervorgerufene Apoptose in Zellen zu provozieren, sofern diese an den Checkpoints des Zellzyklus intervenieren [Zawacka-Pankau *et al.* 2007]. In diesem Sinne dürfte die Anfälligkeit der Zellen für Tetrapyrrol-induzierte DNA-Schädigungen von der Phase des Zellzyklus, in dem sie sich zum Zeitpunkt der Inkubation befinden, abhängig sein.

Negative Korrelationen zwischen dem Ausmaß an DNA-Schädigung durch Bilirubin Dimethylester und Protoporphyrin und dem prozentuellen Anteil an Zellen in der G0/1 Phase des Zellzyklus bestätigen diese Hypothese. Je größer also das Ausmaß der DNA-Schädigung durch die genannten Tetrapyrrole, desto mehr Zellen befinden sich in Zellzyklus Arrest und durchlaufen die weiteren Phasen des Zellzyklus nicht. Die Tatsache, dass alle vier getesteten Tetrapyrrole negative Zusammenhänge mit dem Anteil an Zellen in der S-Phase des Zellzyklus aufweisen, unterstreicht diese Feststellung. Biliru-

bin Ditaurat zeigt diesen Zusammenhang zusätzlich auch mit der Menge an Zellen in der G2/M Phase.

Die DNA-Synthese- sowie die Zellteilungsrate der HepG2-Zellen dürften also tatsächlich durch physiologische Tetrapyrrole gehemmt werden. Mit Ausnahme des Bilirubins, das im statistischen Test eine starke positive Korrelation mit dem Anteil an Zellen in der G0/1 Phase zeigt und somit auf ein Fehlen des Zellzyklus Arrests hinweist. Eine Beobachtung, die sich durchaus mit der festgestellten antioxidativen Wirkung des Bilirubins auf HepG2-Zellen einhergeht.

Die Klärung dieser Sachverhalte erfordert jedenfalls weitere Arbeiten, die konkret auf die genannten Problemstellungen eingehen und so gezielte Aussagen über das (Nicht-) Vorhandensein einer antikanzerogenen Wirkung von Bilirubin, Bilirubin Ditaurat und Bilirubin Dimethylester zulassen.

Protoporphyrin tritt in der vorliegenden Arbeit mit der Signifikanz seiner antikanzerogenen Wirksamkeit in den Vordergrund. Gemäß den Ergebnissen dürfte dieses Tetrapyrrol die stärksten Effekte von allen aufweisen. Der Grad an DNA-Schädigung ist deutlich und statistisch signifikant konzentrationsabhängig. Dass bereits seine geringste Konzentration (0,5 μm) das Ausmaß an DNA-Schädigung jenes der Negativkontrolle geringfügig überschreitet spricht für das Potenzial von Protoporphyrin.

In der Literatur wird Protoporphyrin vor allem in Hinblick auf seine Einsatzmöglichkeit und Effektivität in der Therapie bestimmter Krebsarten diskutiert [Hovhannisyan *et al.* 2005]. Diese basiert auf seiner Lichtsensitivität, die bei Ablagerungen des Tetrapyrrols in bestimmten Geweben Zellen mittels Lichtinduktion schädigen kann. Der Mechanismus der dieser Wirkung zu Grunde liegt, dürfte die Bindung an die Tumorsuppressoren p53 [Zawacka-Pankau *et al.* 2007] und p73 [Sznarkowska *et al.* 2011] sein, die anhand ihre proapoptotischen Eigenschaften die Zerstörung der Krebszellen bedingt. Dieser Effekt konnte bisher an Kolonkrebszellen [Zawacka-Pankau *et al.* 2007] und Zervixkarzinomzellen (HeLa) [Bednarz *et al.* 2007] beobachtet werden.

Einer Arbeit von Koningsberger und Kollegen zu Folge vermag Protoporphyrin auch DNA-schädigende Wirkung an Krebszellen ohne einen Einfluss von Licht zu haben. Bereits Konzentrationen dieses Tetrapyrrols zwischen 0,5-100 µg/ml zeigten dahingehend *in vitro* die Hemmung der Zellproliferation von HeLa-Zellen [Koningsberger *et al.* 1995]. Im Zusammenhang mit HepG2-Zellen kann an dieser Stelle auf das Ergebnis der vorliegenden Arbeit hingewiesen werden konnte.

Auch der Einsatz von Protoporphyrinderivaten wie beispielsweise Zink-Protoporphyrin erbrachte sowohl *in vitro* an Kolonkrebszellen als auch *in vivo* an tumorösen Mäusen Erkenntnisse über antikanzerogene Effekte [Fang *et al.* 2003].

Unabhängig von der Wirkung humaner Tetrapyrrole lässt die vorliegende Arbeit Aussagen über eine zellschädigende Wirkung des verwendeten Stressfaktors Tertiärbutylhydroperoxid zu. In allen durchgeführten Experimenten wiesen die Negativ- und Positivkontrollen signifikante Unterschiede auf. Als natürlich vorkommende Radikale im menschlichen Organismus haben Hydroperoxide demnach nicht nur im Sinne der DNA-Schädigung physiologischer Körperzellen [Betteridge 2000] eine Bedeutung, sondern offensichtlich auch im Zusammenhang mit der Zerstörung pathologisch entarteter Gewebe.

Korrelationen der DNA-Schädigung durch die Tetrapyrrole Bilirubin und Protoporphyrin mit dem Anteil intrazellulär vorhandener Hydroperoxide und Superoxide zeigen dahingehend sowohl eine Verstärkung des Schädigungseffekts in t-BOOH-behandelten Zellen (Protoporphyrin), als auch deren vermehrtes Vorhandensein in geschädigten Zellen ohne vormalige Behandlung mit oxidativen Reagenzien (Bilirubin, Protoporphyrin).

VI. CONCLUSIO

Die physiologische Bedeutung humaner Gallenpigmente und ihrer Derivate umfasst bisweilen ein weitreichendes Gebiet der Wissenschaft. Einige ihrer Eigenschaften konnten bereits mit starker Evidenz belegt werden, so beispielsweise ihre antioxidativen Kapazitäten.

Die Erkenntnisse im Zusammenhang mit ihrer antikanzerogenen Wirkung unterliegen nach wie vor zu einem großen Teil vagen Vermutungen. Die vorliegende Arbeit konnte zwar bereits diskutierte antikanzerogene Effekte des Gallenpigments Protoporphyrin untermauern, verwehrt jedoch die Bestätigung der gleichermaßen publizierten Eigenschaften des Bilirubins. Des Weiteren konnte auch für die bisher vollkommen unerforschten Tetrapyrrole Bilirubin Ditaurat und Bilirubin Dimethylester keine klare Aussage zu einer etwaigen antikanzerogenen Wirkung getroffen werden, da die Ergebnisse dahingehend lediglich sehr schwache Tendenzen aufzeigen. Die vorliegende Arbeit bietet sowohl methodisch als auch im Sinne ihrer Limitationen (mögliche Zelllinienselektivität einer antikanzerogenen Wirkung, Membrangängigkeit ausgewählter Tetrapyrrole) einen guten Ansatz für folgende Arbeiten, die zur Klärung einer tatsächlichen antikanzerogenen Wirkung unabdingbar sind.

Der Fokus zukünftiger Arbeiten sollte in erster Linie auf die Erforschung der Wirkmechanismen hinter potenziell antikanzerogenen Wirkungsweisen gelegt werden. Erst die Klärung dieser grundlegenden Erkenntnisse, erlaubt die Untersuchung komplexerer Fragestellungen in diesem Kontext. Das Ziel folgender Projekte sollte demnach die Erforschung der Integration humaner Gallenpigmente und ihrer Derivate in Apoptosepathways, der Expressierung relevanter Checkpoint-Proteine sowie diverser Anti-Onkogene (wie beispielsweise p53) darstellen.

ZUSAMMENFASSUNG

Viele Jahre eilte den Gallenpigmenten und ihren Derivaten ein Ruf als toxische Abfallprodukte des menschlichen Organismus voraus. Während insbesondere das Bilirubin, in der Indischen und Traditionellen Chinesischen Medizin schon vor tausenden von Jahren gezielt zur Therapie bestimmter Erkrankungen eingesetzt wurde, galten diese Tetrapyrrole in unseren Breiten lange Zeit als unbrauchbare, toxische Häm-Abbauprodukte. Heutzutage kennt man ihre physiologische Bedeutung in Hinblick auf ihre antioxidativen, antimutagenen, antikomplementären, antiinflammatorischen, antiapoptotischen, antibakteriellen und antiviralen Eigenschaften bei moderat erhöhten Blutspiegeln. Kürzlich publizierte Hinweise auf eine mögliche antikanzerogene Wirkung stellen die zentrale Fragestellung dieser Arbeit dar.

Das Ziel der Arbeit war, einen wertvollen Beitrag zur aktuell sehr geringen Datenlage in Bezug auf humane Tetrapyrrole und ihre möglichen antikanzerogenen Wirkung zu leisten. Mit Ausblick auf eine längerfristige Etablierung neuer Therapieformen soll diese einen weiteren Fortschritt in der Beleuchtung des komplexen Systems der Krebserkrankungen erbringen.

Die vorliegende *in vitro* Studie untersuchte antikanzerogene Effekte der Tetrapyrrole Bilirubin IX α , Bilirubin Ditaurat, Bilirubin Dimethylester und Protoporphyrin IX in drei Konzentrationen (0,5 μ M, 5 μ M, 17 μ M) an der humanen Leberkrebszelllinie HepG2. Die quantitative Erfassung induzierter DNA-Schäden erfolgte mittels Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)-Verfahren (Comet Assay) nach 24-stündiger Tetrapyrrol-Inkubation der Kulturzellen.

Eine deutliche antikanzerogene Aktivität konnte im Rahmen dieser Arbeit für das Tetrapyrrol Protoporphyrin belegt werden. Bilirubin, Bilirubin Ditaurat und Bilirubin Dimethylester zeigten lediglich eine vage Tendenz die DNA der Leberkrebszellen HepG2 zu schädigen.

ABSTRACT

For decades bile pigments and derivatives were exclusively considered as toxic waste products formed within the human heme catabolic pathway. While especially bilirubin had been used in the indian and traditional chinese medicine for thousands of years for the treatment of certain diseases, these tetrapyrroles have been considered as use-less at best and toxic byproducts at worst in our region for a long time. Nowadays we know about their beneficial effects in terms of anti-oxidant, anti-mutagenic, anti-complementary, anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-bacterial and anti-viral properties at moderately elevated bloodlevels. The recently published evidence for a possible anti-carcinogenic effect represents the main question of this work.

The aim of this work was to add a substantial contribution to the currently very limited knowledge on tetrapyrrole anticarcinogenesis and to shed light on the complex system of cancer pathogenesis with view to the long-term establishment of novel possibilities in treatment.

In the present study *in vitro* anti-carcinogenic effects of the human tetrapyrroles bilirubin, bilirubin ditaurate, bilirubin dimethyl ester and protoporphyrin were investigated at three physiologically relevant concentrations (0.5 μ M, 5 μ M, 17 μ M) in human hepatocarcinoma cell line HepG2. The quantitative detection of induced DNA damage was performed using the single cell gel electrophoresis (SCGE) assay (comet assay) after 24 hours of tetrapyrrole incubation.

Protoporphyrine was significantly anti-carcinogenic, whereas the remaining compounds (bilirubin, bilirubin ditaurate and bilirubin dimethyl ester) tended to increase DNA damage in HepG2 cells.

LITERATURVERZEICHNIS

- ADEN DP, FOGEL A, PLOTKIN S. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; 282:615-616
- AMES BN, McCANN J, YAMASAKI E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975; 31: 347-364
- ARIMOTO K, KAN-YAMA H, RAI H, HAYATSU H. Inhibitory effect of hemin, chlorophyllin and related pyrrole pigments on the mutagenicity of benzo[a]pyrene and its metabolites. *Mutat Res* 1995; 345: 127-135
- BALLET F, BOUMA ME, WANG SR. Isolation, culture and characterisation of human hepatocytes from surgical liver biopsies. *Hepatology* 1984; 4: 849-854
- BATTERSBY AR. Tetrapyrrolo: the pigments of life. *Nat. Prod. Rep.* 2000; 17: 507-526
- BEDNARZ N, ZAWACKA-PANKAU J, KOWALSKA A. Protoporphyrin IX induces apoptosis in HeLa cells prior to photodynamic treatment. *Pharmacological Reports* 2007; 59: 474-479
- BENARON DA, BOWEN FW. Variation of initial serum bilirubin rise in newborn infants with type of illness. *Lancet* 1991; 338: 78-81
- BERNARD K, RITZEL G, STEINER KU. Über eine biologische Bedeutung der Gallenfarbstoffe: Bilirubin und Biliverdin als Antioxydantien für das Vitamin a und die essentiellen Fettsäuren. *Helv. Chim. Acta* 1954; 37: 306-313
- BETTERIDGE DJ. What Is Oxidative Stress? *Metabolism* 2000; 49(2) Suppl. 1: 3-8

- BOSMA PJ. Inherited Disorders of bilirubin metabolism. *Journal of Hepatology* 2003; 38: 107-117
- BOUMA ME, ROGIER E, VERTHIER N, LABARRE C, FELDMANN G. Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived Cell line Hep G2: Morphologie and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 1989; 25(3): 267-275
- BREIMER LH, WANNAMETHEE G, EBRAHIM S, SHAPER AG. Serum bilirubin and risk of ischemic heart disease in middle-aged British men. *Clin Chem* 1995; 41: 1504-1508
- BRODERSEN R. Bilirubin. Solubility and interaction with albumin and phospholipid. *J Biol Chem* 1979; 254(7): 2364-2369
- BULMER AC, BLANCHFIELD JT, COOMBES JS, TOTH I. In vitro permeability and metabolic stability of bile pigments and the effects of hydrophilic and lipophilic modification of biliverdin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008c; 16: 3616-3625
- BULMER AC, BLANCHFIELD JT, TOTH I, FASSETT RG, COOMBES JS. Improved resistance to serum oxidation in Gilbert's syndrome: A mechanism for cardiovascular protection. *Atherosclerosis* 2008b; 199: 390-396
- BULMER AC, RIED K, BLANCHFIELD JT, WAGNER KH. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutation Research* 2008a; 658: 28-41
- BURCHELL B, HUME R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1999; 14: 960-966
- CHEPELEV LL, BESHARA CS, MACLEAN PD, HATFIELD GL, RAND AA, THOMPSON A, WRIGHT JS, BARCLAY LRC. Polypyrroles as Antioxidants: Kinetic Studies on Reactions of Bilirubin and Biliverdin Dimethyl Esters and Synthetic Model Compounds with Peroxyl Radicals in Solution – Chemical Calculations on Selected Typical Structures. *J Org Chem* 2006; 71(1): 22-30

- CHERIYATH P, GORREPATI VS, PETERS I, NOOKALA V, MURPHY ME, SROUJI N, FISCHMAN D. High total bilirubin as a protective factor for diabetes mellitus: an analysis of NHANES data from 1996-2006. J Clin Med Res 2010; 2: 201-206
- CHIN HJ, SONG YR, KIM HS, PARK M, YOON HJ, NA KY, KIM Y, CHAE DW, KIM S. The Bilirubin Level is Negatively Correlated with the Incidence of Hypertension in Normotensive Korean Population. J Korean Med Sci 2009; 24(Suppl 1): 50-56
- CHOI SH, YUN KE, CHOI H. Relationships between serum total bilirubin levels and metabolic syndrome in Korean adults. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2011; doi:10.1016/j.numecd.2011.03.001
- CHOUCROUN P, GILLET D, DORANGE G, SAWICKI B, DEWITTE JD. Comet assay and early apoptosis. Mutation Research 2001; 478: 89-96
- COX GS, WHITTEN DG. Mechanisms for the Photooxidation of Protoporphyrine IX in Solution. J Am Chem Soc 1982; 104: 516-521
- CRAWFORD JM, RANSIL BJ, NARCISO JP, GOLLAN JL. Hepatic Microsomal Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase – The Kinetics of Bilirubin Mono- and Diglucuronide Synthesis. The Journal of Biological Chemistry 1992; 267(24): 16943-16950
- DE FLORA S, ROSENKRANZ HS, KLOPMAN G. Structural basis of antimutagenicity of chemicals towards 4-nitroquinoline 1-oxide in *Salmonella typhimurium*. Mutagenesis 1994; 9: 39-45
- DENNERY PA, MC DONAGH AF, SPITZ DR, RODGERS PA, STEVENSON DK. Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. Free Radic Biol Med 1995; 19: 395-404
- DJOUSSE L, LEVY D, CUPPLES LA, EVANS JC, D'AGOSTINO RB, ELLISON RC. Total serum bilirubin and risk of cardiovascular disease in the Framingham offspring study. Am J Cardiol 2001; 87: 1196-1200

- DJOUSSE L, ROTHMAN KJ, CUPPLES LA, LEVY D, ELLISON RC. Effect of serum albumin and bilirubin on the risk of myocardial infarction (the Framingham offspring Study). *Am J Cardiol* 2003; 91: 485-488
- DOENECKE D, KOOLMAN J, FUCHS G, GEROK W. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 15. Auflage 2005; 187
- DORÉ S, TAKAHASHI M, FERRIS CD, ZAKHARY R, HESTER LD, GUASTELLA D, SNYDER SH. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 2445-2450
- FAIRBAIRN DW, OLIVE PL, O'NEILL KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 1995; 339: 37-59
- FANG J, SAWA T, AKAIKE T, AKUTA T, SAHOO SK, KHALED G, HAMADA A, MAEDA H. *In Vivo* Antitumor Activity of Pegylated Zinc Protoporphyrin: targeted Inhibition of heme Oxygenase in Solid Tumor. *Cancer Research* 2003; 63: 3567-3574
- FREI B, STOCKER R, AMES BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9748-9752
- GOSSAUER A. Catabolism of Tetrapyrroles. *Chimia* 1994; 48: 352-361
- GRANATO A, GORES G, VILEI MT, TOLANDO R, FERRARESSO C, MURACA M. Bilirubin inhibits bile acid induced apoptosis in rat hepatocytes. *Gut* 2003; 52: 1774-1778
- HEGYI T, GOLDIE E, HIATT M. The protective role of bilirubin in oxygen-radical diseases of the preterm infant. *J Perinatol* 1994; 14: 296-300
- HEINEMANN IU, JAHN M, JAHN D. The biochemistry of heme biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008; 474: 238-251
- HOPKINS PN, WU LL, HUNT SC, JAMES BC, VINCENT GM, WILLIAMS GR. Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16(2): 250-255

- HORSFALL LJ, RAIT G, WALTERS K, SWALLOW DM, PEREIRA SP, NAZARETH I, PETERSEN I. Serum Bilirubin and Risk of Respiratory Disease and Death. *JAMA* 2011; 305(7): 691-697
- HOVHANNISYAN G, AROUTIOUNIAN R, GHAZARYAN R, GEVORGYAN A, MARGARYAN K, HAROUTIUNIAN S. DNA damage induced by new porphyrins of different chemical structure. *Korean J Environ Biol* 2005; 379-382
- HULEA SA, WASOWICS E, KUMMEROV FA. Inhibition of metal-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein by free and albumin-bound bilirubin. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1259: 29-38
- HUNT SC, KRONENBERG F, ECKFELDT JH, HOPKINS PM, MYERS RH, HEISS G. Association of plasma bilirubin with coronary heart disease and segregation of bilirubin as a major gene trait: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 2001; 154: 747-754
- HUTCHINSON DW, JOHNSON B, KNELL AJ. The Synthesis of Esters of Bilirubin. *Biochem J* 1973; 133: 493-498
- ILZECKA J, STELMASIAK Z. Serum bilirubin concentration in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2003; 105: 237-240
- JIRÁKOVSKÁ A, NOVOTNÝ J, NOVOTNÝ L, VODICKA P, PARDINI B, NACCARATI A, SCHWERTNER HA, HUBÁČEK A, PUNCOCHÁROVÁ L, SMERHOVSKÝ Z, VÍTEK L. Association of serum bilirubin and promoter variations in HMOX1 and UGT1A1 genes with sporadic colorectal cancer. In *J Cancer* 2011; doi: 10.1002/ijc.27412 [Epub ahead of print]
- JIRSA M, JIRSA M Jr., KUBÁT P. Bilirubin ditaurate – a sensitive compound for examination of photosensitizers. *Sb Lek* 1995; 96(1): 1-6

- KAMISAKO T, KOBAYASHI Y, TAKEUCHI K, ISHIHARA T, HIGUCHI K, TANAKA Y, GABAZZA EC, ADACHI Y. Recent advances in bilirubin metabolism research: the molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance. *J Gastroenterol* 2000, 35: 659-664
- KAPITULNIK J. Bilirubin: An Endogenous Product of Heme Degradation with Both Cytotoxic and Cytoprotective Properties. *Molecular Pharmacology* 2004; 66(4): 773-779
- KAPLAN D, NAVON G. Studies of the conformation of bilirubin and its dimethyl ester in dimethyl sulfoxide solutions by nuclear magnetic resonance. *Biochem J* 1982; 201: 605-613
- KESHAVAN P, SCHWEMBERGER SJ, SMITH DL, BABCOCK GF, ZUCKER SD. Unconjugated bilirubin induces apoptosis in colon cancer cells by triggering mitochondrial depolarization. *Int J Cancer* 2004; 112(3): 433-445
- KIKUCHI G, YOSHIDA T. Function and induction of the microsomal heme oxygenase. *Mol Cell Biochem* 1983; 53-54: 163-183
- KIM SY, PARK SC. Physiological antioxidative network of the bilirubin system in aging and age-related diseases. *Frontiers in Pharmacology* 2012; 3: Article 45
- KLATSKIN G. Bile Pigment Metabolism. *Annu Rev Med* 1961; 12: 211-250
- KNOWELS BB, HOWE CC, ADEN DP. Human hepatoblastoma cell line secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 1980; 209: 497-499
- KO GT, CHAN JC, WOO J, LAU E, YEUNG VT, CHOW CC, LI JK, SO WY, COCKRAM CS. Serum bilirubin and cardiovascular risk factors in a Chinese population. *J Cardiovasc Risk* 1996; 3: 459-463

- KO WF, HELZLSOUER KJ, COMSTOCK GW. Serum albumin, bilirubin and uric acid and the anatomic site-specific incidence of colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 1874-1875
- KÖNIGSHOFF M, BRANDENBURGER T. *Kurzlehrbuch Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2. Auflage 2007; 300-301
- KONINGSBERGER JC, RADEMAKERS LHPM, VAN HATTUM J, BAART DE LA FAILLE H, WIEGMANN LJJM, ITALIAANDER E, VAN BERGE HENEGOUWEN GP, MARX JJM. Exogenous Protoporphyrin inhibits HepG2 cell proliferation and causes ultrastructural alterations. *Journal of Hepatology* 1995; 22: 57-65
- KOOLMAN J, RÖHM KH. *Taschenatlas der Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2. Auflage 1998; 186-189
- LABORI KJ, LYBERG T, RAEDER MG. Effects of bilirubin ditaurate overload on canalicular membrane function and ultrastructure of the pig liver. *Injury, Int. J. Care Injured* 2009; 40: 868-872
- LIN JP, O'DONNELL CJ, SCHWAIGER JP, CUPPLES LA, LINGENHEL A, HUNT SC, YANG S, KRONENBERG F. Association between the UGT1A1*28 allele, bilirubin levels, and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2006; 114(14): 1476-1481
- LIN YC, CHANG PF, HU FC, CHANG MH, NI YH. Variants in the UGT1A1 gene and the risk of pediatric nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatrics* 2009, 124: e1221-e1227
- LIU Y, LI P, LU J, XIONG W, OGER J, TETZLAFF W, CYNADER M. Bilirubin possesses powerful immunomodulatory activity and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2008; 181(3): 1887-1897

- LIU Y, LIU J, TETZLAFF W, PATY DW, CYNADER MS. Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Free Radical Biology & Medicine* 2006; 40: 960-967
- LIU Y, ZHU B, WANG X, LUO L, LI P, PATY DW, CYNADER MS. Bilirubin as a potent antioxidant suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the role of oxidative stress in the development of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2003; 139(1-2): 27-35
- LÖFFLER G, PETRIDES PE, HEINRICH PC. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, 8. Auflage 2006; 301-303; 621-626
- MADHAVAN M, WATTIGNEY WA, SRINIVASAN SR, BERENSON GS. Serum bilirubin distribution and its relation to cardiovascular risk in children and young adults. *Atherosclerosis* 1997; 131: 107-113
- MAINES MD, KAPPAS A. Metals as regulators of heme metabolism. *Science* 1977; 198: 1215-1221
- McDONAGH AF. Controversies in bilirubin biochemistry and their clinical relevance. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 2010; 15: 141-147
- McPHEE F, CALDERA PS, BEMIS GW, McDONAGH GF, KUNTZ ID, CRAIK CS. Bile pigments as HIV-1 protease inhibitors and their effects on HIV-1 viral maturation and infectivity *in vitro*. *Biochem J* 1996; 320: 681-686
- MINETTI M, MALLOZZI C, STAZI AMMD, PIETRAFORTE D. Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma. *Arch Biochem Biophys* 1998; 352:165-174
- MÖLZER C, HUBER H, STEYRER A, ZIESEL G, WALLNER M, ERTL A, PLAVOTIC A, BULMER A, WAGNER KH. In vitro antioxidant capacity and anti-genotoxic properties of protoporphyrin and structurally related tetrapyrroles. *Free Radical Research* 2012.

- MURACA M, BLANCKAERT N. Liquid-Chromatographic Assay and Identification of Mono- and Diester of Bilirubin in Normal Serum. Clin Chem 1983; 29(10): 1767-1771
- NELSON D, COX M. Lehninger Biochemie. Springer Verlag, 4. Auflage 2008; 1154-1156
- NEUZIL J, STOCKER R. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. FEBS Lett 1993; 331: 281-284
- NEUZIL J, STOCKER R. Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. J Biol Chem 1994; 269: 16712-16719
- NOVOTNY L, VÍTEK L. inverse relationships between serum bilirubin and atherosclerosis in men: A meta-analysis of published studies. Exp Biol Med 2003; 228: 568-571
- OHRUI T, HIGUCHI M, KANDA A, MATSUI T, SATO E, SASAKI A. A patient with exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis which was resolved probably due to the co-existing hyperbilirubinemia? Tohoku J Exp Med 2001; 193: 245-249
- OSTROW JD, TIRIBELLI C. Bilirubin, a curse and a boon. Gut 2003; 52: 1668-1670
- OTANI K, SHIMZU S, CHIJIIWA K, YAMAGUCHI K, KUROKI S, TANAKA M. Increased urinary excretion of bilirubin oxidative metabolites in septic patients: a new marker for oxidative stress in vivo. J Surg Res 2001; 96: 44-49
- PAPADAKIS JA, GANOTAKIS ES, JAGROOP IA, MIKHAILIDIS DP, WINDER AF. effect of hypertension and its treatment lipid lipoprotein(a), fibrinogen and bilirubin levels in patients referred for dyslipidemia. Am J Hypertens 1999; 12: 673-681

- PENG F, DENG X, YU Y, CHEN X, SHEN L, ZHONG X, QIU W, JIANG Y, ZHANG J, HU X. serum bilirubin concentrations and multiple sclerosis. *Journal of Clinical Neuroscience* 2011; 18: 1355-1359
- QIN X. Bilirubin would be the indispensable component for some of the most important therapeutic effects of *Calculus Bovis (Niu Huang)*. *Chin Med J* 2008; 121(5): 480
- RADU P, ATSMON J. Gilbert's Syndrome – Clinical and Pharmacological Implications. *IMAJ* 2001; 3: 593-598
- RAO P, SUZUKI R, MIZOBUCHI S, YAMAGUCHI T, SASAGURI S. Bilirubin exhibits a novel anti-cancer effect on human adenocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 342: 1279-1283
- READ BE. Chinese materia medica: Animal Drugs. Taipei: Southern Materials Center, Inc. 1976
- REITER R, WENDEL A. Selenium and drug metabolism-I. Multiple modulations of mouse liver enzymes. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 3063-3067
- RYTER SW, TYRRELL RM. The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidant sensitivity. Heme Oxygenase has Both Pro- and Antioxidant Properties. *Free Radical Biology & Medicine* 2000; 28(2): 289-309
- RYTER SW. Bile Pigments in pulmonary and vascular disease. *Frontiers in Pharmacology* 2012; 3: Article 39
- SANTANGELO R, MANCUSO C, MARCHETTI S, DI STASIO E, PANI G, FADDA G. Bilirubin: an endogenous molecule with antiviral activity *in vitro*. *Frontiers in Pharmacology* 2012; 3: Article 36

- SCHWERTNER HA, JACKSON WG, TOLAN G. Association of low serum concentrations of bilirubin with increased risk of coronary artery disease. Clin Chem 1994; 40: 18-23
- SCHWERTNER HA, VÍTEK L. Gilbert syndrome, UGT1A1*28 allele and cardiovascular disease risk: Possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. Atherosclerosis 2008; 198: 1-11
- SEDLAK TW, SNYDER SH. Bilirubin Benefits: Cellular Protection by a Biliverdin Reductase Antioxidant Cycle. Pediatrics 2004; 113(6): 1776-1782
- SHEAR NH, MALKIEWICZ IM, KLEIN D, KOREN G, RANDOR S, NEUMAN MG. Acetaminophen-Induced Toxicity to Human Epidermoid Cell Line A431 and Hepatoblastoma Cell Line HepG2, in Vitro, is diminished by Silymarin. Skin Pharmacology 1995; 8(6): 279-291
- SIEGENTHALER W. Klinische Pathophysiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage 1973; 740-755
- SILBERNAGL S, DESPOPOULOS A. Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 6. Auflage 2003; 250-251
- SILBERNAGL S, LANG F. Taschenatlas der Pathophysiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York, 2. Auflage 2005; 30-37; 168-169; 244-245
- SIMON NG, HERKES GK. The neurologic manifestations of acute porphyrias. Journal of Clinical Neuroscience 2011; 18: 1147-1153
- SNYDER SH, BARANANO DE. Heme Oxygenase: A Font of Multiple Messengers. Neuropsychopharmacology 2001; 25(3): 294-298
- STEVENSON DK, WONG RJ. Metalloporphyrins in the management of neonatal hyperbilirubinemia. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine 2010; 15: 164-168

- STOCKER R, AMES BN. Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 8130-8134
- STOCKER R, GLAZER AN, AMES BN. Antioxidant Activity of albumin bound bilirubin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987b; 84: 5918-5922
- STOCKER R, YAMAMOTO Y, MC DONAGH AF, GLAZER AN, AMES BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987a; 235: 1043-1046
- STOCKER R. Antioxidant Activities of Bile Pigments. *Antioxidants & Redox Signaling* 2004; 6(5): 841-849
- STRASSBURG CP. Hyperbilirubinemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2010; 555-571
- SZNARKOWSKA A, MALENCZYK K, KADZINSKI L, BIELAWSKI KP, BANECKI B, ZAWACKA-PANKAU J. Targeting of p53 and its homolog p73 by protoporphyrin IX. *FEBS Lett* 2011; 585: 255-260
- TANG X, EDENHARDER R. Inhibition of the mutagenicity of 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene and 1-nitropyrene by vitamins, porphyrins and related compounds and vegetable and fruit juices and solvent extracts. *Food Chem Toxicol* 1997; 35: 373-378
- TEMME EH, ZHANG J, SCHOUTEN EG, KESTELOOT H. Serum bilirubin and 10-year mortality risk of a Belgian population. *Cancer Causes Control* 2001; 12: 887-894
- THOMAS SR, DAVIES MJ, STOCKER R. Oxidation and antioxidation of human low-density lipoprotein and plasma exposed to 3-morpholinolinosydnonimine and reagent peroxynitrite. *Chem Res Toxicol* 1998; 11: 484-494

- TOMARO ML, BATLLE AMDC. Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2002; 34: 216-220
- TSUKAHARA H, SHIBATA R, OHSHIMA Y, TODOROKI Y, SATO S, OHTA N, HIRAOKA M, YOSHIDA A, NISHIMA S, MAYUMI N. Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sci* 2003; 72: 2509-2516
- UHL M, HELMA C, KNASMULLER S. Evaluation of the Single Cell Gel Electrophoresis Assay with Human Hepatoma (HepG2) Cells. *Mutation Research* 2000; 468: 213-225
- VÍTEK L, JIRSA M Jr., BRODANOVÁ M, KALÁB M, MARECEK Z, DANZIG V, NOVOTNÝ L, KOTAL P. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 2002; 160: 449-456
- VÍTEK L, SCHWERTNER HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Adv Clin Chem* 2007; 43: 1-57
- VÍTEK L. Impact of Serum Bilirubin on Human Diseases. *Pediatrics* 2005; 115(5): 1411-1412
- WANG X, CHOWDHURY JR, CHOWDHURY NR. Bilirubin metabolism: Applied physiology. *Current Paediatrics* 2006; 16: 70-74
- WEI M, SCHWERTNER HA, GIBBONS LW, ZHENG Q, MITCHELL TL. Low fasting serum bilirubin as a predictor of cancer mortality in men. *Hepatology* 2000; 32: 427
- WIEDEMANN M, KONTUSH A, FINCKH B, HELLWEGE HH, KOHLSCHUTTER A. Neonatal blood plasma is less susceptible to oxidation than adult plasma owing to its higher content of bilirubin and lower content of oxidizable Fatty acids. *Pediatr Res* 2003; 53: 843-849

- WIWANITKIT V. Energy change in the formation of conjugated bilirubin: A possible responsive mechanism for liver cell pathology. *Rev Esp Enferm Dig* 2007; 99(2): 94-95
- WU TW, FUNG KP, WU J, YANG CC, WEISEL RD. Antioxidation of human low density lipoprotein by unconjugated and conjugated bilirubins. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 859-862
- ZANG Q, WANG J, KONG W, JIN C, MA Z, CHEN J, GONG Q, XIAO X. Searching for the main anti-bacterial components in artificial *Calculus bovis* using UPLC and microcalorimetry coupled with multi-linear regression analysis. *J. Sep. Sci.* 2011; 34: 3330-3338
- ZAWACKA-PANKAU J, ISSAEVA N, HOSSAIN S, PRAMANIK A, SELIVANOVA G, PODHAJSKA AJ. Protoporphyrin IX Interacts with Wilde-type p53 Protein in Vitro and Induces Cell Death of Human Colon Cancer Cells in a p53-dependent and - independent Manner. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(4): 2466-2472
- ZELENKA J, MUCHOVA L, ZELENKOVA M, VANOVA K, VREMAN HJ, WONG RJ, VITEK L. Intracellular accumulation of bilirubin as a defense mechanism against increased oxidative stress. *Biochimie* 2012; 1-7
- ZHOU J, TRACY TS, REMMEL RP. Bilirubin Glucuronidation Revisited: Proper Assay Conditions to Estimate Enzyme Kinetics with Recombinant UGT1A1. *Drug metabolism and Disposition* 2010; 38(11): 1907-1911
- ZUCKER SD, HORN PS, SHERMAN KE. Serum bilirubin levels in the U.S. population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer. *Hepatology* 2004; 40: 827-835
- ZUCKER SD, QUIN XF, YU F, GOESSLING W. Inhibition of breast cancer cell proliferation by unconjugated Bilirubin is associated with enhanced expression of apolipoprotein

tein D and increased nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B.
Hepatology 1999; 30: 498

WEBVERZEICHNIS

STATISTIK AUSTRIA 2012a. Krebsprävalenz in Österreich 1983-2009. Homepage der Statistik Austria 2012: http://www.statistik-austria.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/krebspraevalenz/index.html
(Stand: 18. Juni 2012)

STATISTIK AUSTRIA 2012b. Krebsinzidenz in Österreich 1983-2009. Homepage der Statistik Austria 2012: http://www.statistik-austria.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/krebsinzidenz_im_ueberblick/index.html (Stand: 18. Juni 2012)

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Chemische Struktur des Bilirubin IX α Moleküls.	6
Abbildung 2: Chemische Struktur des Bilirubin Konjugats.	10
Abbildung 3: Chemische Struktur des Bilirubin Dimethylesters.	11
Abbildung 4: Chemische Struktur des Protoporphyrin IX.	12
Abbildung 5: Chemische Struktur des Häm-Moleküls.	15
Abbildung 6: Biosynthese des Häms aus Succinyl CoA und Glycin.	19
Abbildung 7: Katabolismus des Häms.	21
Abbildung 8: Diagnostische Kriterien von Hyperbilirubinämien.	25
Abbildung 9: Hepatische Porphyrien.	30
Abbildung 10: Sterilbank.	51
Abbildung 11: Zellkulturfläschchen.	53
Abbildung 12: Countess.	54
Abbildung 13: Well-Platte mit 6 Vertiefungen.	55
Abbildung 14: Beurteilung des Grades einer DNA-Schädigung.	59
Abbildung 15: Zellstressung.	61
Abbildung 16: Elektrophoresekammer.	62
Abbildung 17: Elektronische Datenauswertung.	67

Abbildung 18: Zählschema für die Auswertung der Zellgele.	67
Abbildung 19: Mittlere prozentuelle DNA-Schädigung durch das Tetrapyrrol Bilirubin.	70
Abbildung 20: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin in ungestressten Zellen und dem Vorhandensein intrazellulärer Superoxide.	71
Abbildung 21: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin in ungestressten Zellen und dem Vorhandensein intrazellulärer Hydroperoxide.	72
Abbildung 22: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin in gestressten Zellen und dem Vorhandensein intrazellulärer Hydroperoxide.	72
Abbildung 23: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (G0/1-Phase).	73
Abbildung 24: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (S-Phase).	73
Abbildung 25: Mittlere prozentuelle DNA-Schädigung durch das Tetrapyrrol Bilirubin Ditaurat.	74
Abbildung 26: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin Ditaurat in ungestressten Zellen und dem Ausmaß an Apoptose.	75
Abbildung 27: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin Ditaurat in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (S-Phase).	75
Abbildung 28: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin Ditaurat in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (G2/M-Phase).	76

Abbildung 29: Mittlere prozentuelle DNA-Schädigung durch das Tetrapyrrol Bilirubin Dimethylester.	77
Abbildung 30: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin Dimethylester in ungestressten Zellen und dem Ausmaß an Apoptose.	78
Abbildung 31: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin Dimethylester in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (G0/1-Phase).	78
Abbildung 32: Korrelation der DNA-Schädigung durch Bilirubin Dimethylester in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (S-Phase).	79
Abbildung 33: Mittlere prozentuelle DNA-Schädigung durch das Tetrapyrrol Protoporphyrin.	80
Abbildung 34: Korrelation der DNA-Schädigung durch Protoporphyrin in ungestressten Zellen und dem Ausmaß an Nekrose.	81
Abbildung 35: Korrelation der DNA-Schädigung durch Protoporphyrin in gestressten Zellen und dem Ausmaß an Nekrose.	81
Abbildung 36: Korrelation der DNA-Schädigung durch Protoporphyrin in ungestressten Zellen und dem Vorhandensein intrazellulärer Superoxide.	82
Abbildung 37: Korrelation der DNA-Schädigung durch Protoporphyrin in gestressten Zellen und dem Vorhandensein intrazellulärer Superoxide.	82
Abbildung 38: Korrelation der DNA-Schädigung durch Protoporphyrin in ungestressten Zellen und dem Zellzyklus (G0/1-Phase).	83

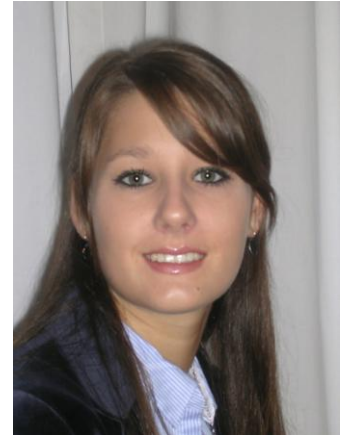
TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Chemikalien.	42
Tabelle 2: Tetrapyrrole.	42
Tabelle 3: Laborzubehör.	43
Tabelle 4: Labortechnik und Geräte.	43
Tabelle 5: Verdünnungsschema der Tetrapyrrol-Stocklösungen.	46
Tabelle 6: Zellkulturzyklus.	51
Tabelle 7: Testzyklus.	55
Tabelle 8: Finale Konzentration der Inkubationslösung.	56
Tabelle 9: Probenschema für die Gelelektrophorese.	60
Tabelle 10: Schematische Darstellung der Probenauswertung des Comet Assay-Tests.	68
Tabelle 11: Signifikanz der Mittelwerte für Bilirubin-induzierte DNA- Schädigung.	70
Tabelle 12: Signifikanz der Mittelwerte für Bilirubin Ditaurat-induzierte DNA-Schädigung.	74
Tabelle 13: Signifikanz der Mittelwerte für Bilirubin Dimethylester-induzierte DNA-Schädigung.	77
Tabelle 14: Signifikanz der Mittelwerte für Protoporphyrin-induzierte DNA- Schädigung.	80

LEBENS LAUF

Antonia Roßmann, Bakk.

Geburtsdatum: 30. Juni 1986
Geburtsort: Graz
Staatsangehörigkeit: Österreich



Ausbildung

10/ 2010 - heute	Master Ernährungswissenschaften an der Universität Wien (Studienschwerpunkt ‚Public Health Nutrition‘)
2006 – 2010	Bakkalaureat Ernährungswissenschaften an der Universität Wien
2004 – 2006	Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz
1996 – 2004	Stiftsgymnasium Admont

Berufserfahrung

05/2011 – 05/2012	Mitarbeit in der Geschäftsstelle der Arbeitsgemeinschaft Klinische Ernährung (AKE)
11/2011 10. – 11. November 2011	Praktikum im Rahmen des Projektes „nutritionDay worldwide“ Wilhelminenspital der Stadt Wien
04/2011	Praktikum in der Geschäftsstelle der Arbeitsgemeinschaft Klinische Ernährung (AKE)
02/2011	Praktikum in der Adipositas-Ambulanz der Klinik für Innere Medizin III AKH Wien
07/2010	Praktikum in der Fa. Landena KG